



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA CARINA PEPINO STELINI

**DOSAGEM DE CORTISOL SALIVAR PRÉ E PÓS-ESTIMULAÇÃO TÁTIL E
CINESTÉSICA EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO: ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO E CONTROLADO**

Dosage of salivary cortisol before and after tactile and kinesthetic stimulation in preterm newborns: randomized controlled trial

CAMPINAS

2017

VANESSA CARINA PEPINO STELINI

**DOSAGEM DE CORTISOL SALIVAR PRE POS-ESTIMULAÇÃO TÁTIL E
CINESTÉSICA EM RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO: ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO E CONTROLADO**

Dosage of salivary cortisol before and after tactile and kinesthetic stimulation in preterm newborns: randomized controlled trial

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

Thesis presented to the School of Medical Sciences of the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining the Doctor of Science degree, area of concentration in the health of the child and adolescent.

ORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA

COORIENTADOR: PROF^a. DR^a. MARIA APARECIDA MARQUES DOS SANTOS MEZZACAPPA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VANESSA CARINA
PEPINO STELINI E ORIENTADA PELO PROF. DR. SÉRGIO
TADEU MARTINS MARBA

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-4346/2015
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9638-9804>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

P393d Pepino, Vanessa, 1980-
Dosagem de cortisol salivar pré e pós- estimulação tátil e cinestésica em recém-nascidos pré-termo : ensaio clínico randomizado e controlado / Vanessa Carina Pepino Stelini. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Sérgio Tadeu Martins Marba.
Coorientador: Maria Aparecida Marques dos Santos Mezzacappa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Prematuro. 2. Massagem. 3. Cortisol. I. Marba, Sérgio Tadeu Martins, 1958-. II. Mezzacappa, Maria Aparecida Marques dos Santos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Dosagem os salivary cortisol before and after tactile and kinesthetic stimulation in preterm newborns : randomized and controlled trial

Palavras-chave em inglês:

Infant, Premature
Massage
Cortisol

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Sérgio Tadeu Martins Marba [Orientador]
Jamil Pedro de Siqueira Caldas
Fabiana Lima Carvalho
Cinira Assad Simão Haddad
Renata Suman Mascaretti

Data de defesa: 27-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VANESSA CARINA PEPINO STELINI

Orientador PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA

**Coorientadora PROF^a. DR^a. MARIA APARECIDA MARQUES DOS SANTOS
MEZZACAPPA**

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA**
 - 2. PROF. DR. JAMIL PEDRO DE SIQUEIRA CALDAS**
 - 3. PROF^a. DR^a. FABIANA LIMA CARVALHO**
 - 4. PROF^a.DR^a. CINIRA ASSAD SIMÃO HADDAD**
 - 5. PROF^a.DR^a. RENATA SUMAN MASCARETTI**
-

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 27 de julho de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todos profissionais que tenham interesse nessa área de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Dra Cida Mezzacappa por tudo que me ensinou nesses anos;

Ao Dr Sérgio Marba por ter aceitado me orientar e por toda ajuda durante a realização desse projeto;

À Dra. Juliana Heinrich-Muçouçah e à toda equipe do Laboratório de Clínico Especializado do CAISM;

À equipe da Science Pro;

À equipe médica e à equipe de enfermagem do CAISM;

Às fisioterapeutas Fabiana Carvalho e a Fernanda Ferraz, pela disposição em ajudar com os TCLEs;

Às FAEPEX e Capes, por terem disponibilizado verba para realização deste projeto;

À equipe da Estatística da FCM-UNICAMP pela análise dos dados;

À Márcia e à equipe da secretaria da pós graduação;

À Aline Gonçalves, pela ajuda durante os testes de coleta;

Às mães/responsáveis e aos RNs que participaram deste projeto;

À Elaine e Juliano pela ajuda incondicional;

Aos familiares e amigos...

Aos meus pais por TUDO...sempre...

Em especial à meu marido Rafael e à minha filha Marcia pelo amor, dedicação, paciência e parceria!!

RESUMO

Os cuidados inerentes à unidade de terapia intensiva neonatal geram estresse aos recém-nascidos pré-termo, porém são indispensáveis para a sobrevivência. Estudos de terapias complementares ao tratamento padrão, visando amenizar o estresse, têm aumentado nos últimos anos. **Objetivo:** Através de um ensaio clínico, randomizado e controlado, comparar os níveis de cortisol salivar, bem como alterações da frequência cardíaca, frequência respiratória e saturação de oxigênio pré- e pós- a aplicação de estimulação tátil e cinestésica em recém-nascidos pré-termo, durante o período de internação, verificando a efetividade e segurança da técnica. **Metodologia:** Foram realizadas duas revisões sistemáticas relacionadas ao tema do projeto, uma avaliando a metodologia utilizada para realização da estimulação tátil em recém-nascidos pré-termo durante o período de internação, e outra avaliando a metodologia utilizada para coleta de saliva nessa população, para dosagem de cortisol. Foram incluídos 33 recém-nascidos pré-termo, com peso ao nascer menor ou igual a 2.000g e idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, clinicamente estáveis há pelo menos cinco dias, que estivessem em incubadora ou berço aquecido. A coleta da saliva foi feita pré- e pós- intervenção, utilizando um *swab* infantil. No grupo controle foi realizada troca de decúbito, semelhante à troca realizada no grupo que recebeu a estimulação tátil e cinestésica. **Resultados:** houve aumento dos níveis de cortisol pós-intervenção no grupo controle ($p= 0.0056$). Em ambos os grupos houve: queda da frequência cardíaca ($p=0.0260$) e respiratória ($p=0.0092$) e aumento da Sat O₂ pós intervenção ($p=0.0115$). **Conclusão:** A estimulação tátil e cinestésica aplicada no período de internação em recém-nascidos pré-termo parece não causar estresse, podendo amenizá-lo quando comparamos ao grupo que recebeu apenas a troca de decúbito.

Palavras chave: recém-nascidos pré-termo; estimulação tátil e cinestésica; cortisol salivar.

ABSTRACT

The care given to a neonatal intensive care unit generates stress for preterm infants, but they are essential for survival. Studies of therapies complementary to the standard treatment, aimed at easing stress, have increased in recent years. Objective: To compare salivary cortisol levels, as well as changes in heart rate, respiratory rate and oxygen saturation before and after the application of tactile and kinesthetic stimulation in preterm newborns during the period of NICU admission, verifying the effectiveness and safety of the technique. Methodology: Two systematic reviews related to the project theme were carried out, one evaluating the methodology used to perform tactile stimulation in preterm newborns during the hospitalization period, and another evaluating the methodology used to collect saliva in this population, in order to dosage of cortisol. The clinical trial included 33 preterm newborns with birth weight less than or equal to 2000 g and gestational age less than or equal to 37 weeks, clinically stable for at least five days, who were in an incubator or heated crib. The saliva collection was done before and after intervention, using a child swab. In the control group, a change of position was performed, similar to the change in the protocol used for tactile and kinesthetic stimulation. Results: there was an increase in post-intervention cortisol levels in the control group ($p = 0.0056$). In both groups there was a decrease in heart rate ($p = 0.0260$) and respiratory rate ($p = 0.0092$) and increase in Sat O₂ post intervention ($p = 0.0115$). Conclusion: The tactile and kinesthetic stimulation applied in the period of hospitalization in preterm newborns does not seem to cause stress, which may make it milder when compared to the group that received only the change of decubitus.

Key words: preterm newborns; tactile and kinesthetic stimulation; salivary cortisol

LISTA DE FIGURAS

1	Artigo 2 Figura 1: <i>Flowchart</i>
2	Artigo3 Figura 1: Resultado da Análise de dosagem de cortisol
3	Artigo3 Figura 2: Resultado da análise da FC
4	Artigo 3 Figura 3: Resultado da análise da FR
5	Artigo 3 Figura 4: Resultado da análise da SatO ₂
6	Artigo 3 Figura 5: Resultado da análise da temperatura corporal

LISTA DE TABELAS

1	Artigo 1 Table 1: Description of the studies included in this review
2	Artigo 2 Table 1. Description of study objectives
3	Artigo 2 Table 2. Description of collection method, material, assay and % of sample
4	Artigo 2 Table 3. Evaluation of % loss according to the studied factors (type , material, essay and collection time) - META REGRESSION
5	Artigo 3 Tabela 1: Distribuição percentual das variáveis categóricas descritivas da amostra
6	Artigo 3 Tabela 2: Distribuição das variáveis numéricas descritivas da amostra

LISTA DE ABREVIATURAS

AIG: adequado para idade gestacional

ANOVA: análise de variância

CAISM: Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

DD: decúbito dorsal

DV: decúbito ventral

EC: estimulação cinestésica

ELISA: Imunoensaioenzimático

Embase: Excerpta Medica Database

EndNote: Software Gerenciador de bibliografias

ET: estimulação tátil

ETC: estimulação tátil e cinestésica

EUA: Estados Unidos da América

EXCEL: Software de Planilhas Eletrônicas

FC: frequência cardíaca

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

FR: frequência respiratória

IGF-1: fator de crescimento insulina 1

KS: kinesthetic stimulation

MT: massage therapy

Min: minuto

NICU: neonatal intensive care unit

NIDCAP: Programa de Cuidados Centrados no Desenvolvimento

PEDro: Physiotherapy Evidence Database

PI: preterm infants

PIG: pequeno para idade gestacional

PTN: preterm newborns

PubMed: United States National Library of Medicine of the National Institutes of Health

ReBEC: Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos

RN: recém-nascido

RNPT: recém-nascidos pré-termo

SatO₂: saturação de oxigênio

Scopus: Base de Dados Scopus

SIS: *Saliva Bio Infant's Swab*[®]

TCLE: termo de consentimento Livre e esclarecido

TS: tactile stimulation

Ul: microlitros

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UTIN: unidade de terapia intensiva neonatal

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
Objetivo Geral.....	16
Objetivos Específicos.....	17
Desenho do estudo	17
Tamanho Amostral	17
Variáveis	17
Variáveis dependentes	17
Variáveis Independentes	18
Variáveis Descritivas	18
Seleção dos sujeitos	19
CrITÉRIOS de Inclusão.....	19
CrITÉRIOS de Exclusão	20
CrITÉRIOS de Descontinuação	20
Instrumento para coleta de dados	20
Coleta de dados	20
CONTROLE DE QUALIDADE	24
RESULTADOS	26
Artigo 1	27
Artigo 2	55
Artigo 3	76
DISCUSSÃO GERAL	104
CONCLUSÃO GERAL	107
APENDICES	112
ANEXO 1-Lista de checagem para inclusão	114
ANEXO 2-Ficha para coleta de dados.....	115
ANEXO 3: TCLE.....	117
ANEXO 4: Parecer do CEP	119
ANEXO 5: Tabela análise estatística.....	122

INTRODUÇÃO

O cuidado com o crescimento e o desenvolvimento de recém-nascidos pré-termo (RNPT) é de relevante importância, uma vez que a prematuridade é a causa mais frequente de morbidade neonatal. Diferentes estudos reconhecem a necessidade de minimizar o impacto negativo de intervenções inerentes ao ambiente da terapia intensiva neonatal, imprescindíveis para a sobrevivência desses pacientes, mas por vezes, invasivas e agressivas.¹

Procedimentos simples como banho ou troca de fraldas^{2,3} ou mais invasivos como aspiração traqueal⁴ podem se associar ao aumento do cortisol ou à reações comportamentais que expressam estresse. Por sua vez, o estresse pode determinar importantes repercussões nos comportamentos motores e nos exames neurocomportamentais, além de ter associação com alterações cerebrais estruturais e funcionais.⁵ Choro, irritabilidade, tremores, bocejos, soluços, vômito, aumento de frequências cardíaca e respiratória, aumento da pressão arterial, apneia, irregularidade respiratória são alguns sinais de desconforto em recém-nascidos (RN).⁶

Métodos não invasivos para avaliação da eficácia de terapias complementares que visam auxiliar na diminuição do estresse dentro das UTIN (como musicoterapia,⁷ estimulação tátil e cinestésica⁸, método canguru⁹), tem sido aplicados em vários estudos recentes, dentre eles dosagem do cortisol salivar, uma vez que os níveis de cortisol podem ser detectados na saliva desde a primeira semana de vida.¹⁰ A dosagem de cortisol salivar é um método simples para a avaliação da atividade adrenal, podendo ser aplicado nas crianças de forma prática e não-invasiva.¹¹ É o biomarcador mais comumente usado para medir a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em todas as populações em função do seu papel importante no estresse e mecanismos neuroendócrinos.¹²

A estimulação tátil e cinestésica (ETC) tem sido proposta por alguns autores, associada ao tratamento médico padrão, com o intuito de auxiliar nos cuidados desses RNPT. A ETC pode ser realizada por terapeutas profissionais e/ou pelas respectivas mães. Este procedimento consiste em realizar uma manipulação sistemática do paciente, através de movimentos de deslizamento pelo corpo, com pressão moderada, realizados com as mãos do terapeuta na cabeça, tronco e membros, e pode ser associado à estimulação cinestésica, por intermédio de movimentos passivos de flexão e extensão dos membros.¹³ Este tipo de intervenção tem sido

estudada com o objetivo principal de avaliar se há benefício no crescimento e desenvolvimento dos RN. ¹⁴⁻¹⁷

Alguns estudos mostraram que a ETC, instituída durante a estadia hospitalar, melhora o ganho de peso e reduz o tempo de internação, entre outros benefícios, como redução da ocorrência da sepse precoce ¹⁷⁻²². Esses estudos seguiram um protocolo de estimulação tátil proposto por Field e cols., em 1986, na Universidade de Miami, nos EUA. O procedimento de estimulação consiste de três fases padronizadas com duração de cinco minutos cada, sendo feita a estimulação tátil (ET) durante a primeira e a terceira fase e a estimulação cinestésica (EC) durante a fase intermediária. Nesse estudo, feito por Field e cols, houve um aumento médio de 47% no ganho de peso no grupo que recebeu a ETC em comparação ao grupo controle (25g/dia contra 17g/dia). Além disso, os RN ficaram mais ativos e alertas, mostraram melhores índices comportamentais segundo a Escala de Brazelton, além de menor tempo de internação.²¹ Este estudo foi de grande importância não somente por ter sido um dos primeiros sobre o efeito da ETC no crescimento de RNPT, mas também por ter sido utilizado como referência para a introdução da ETC em estudos subsequentes.

Ao estudar apenas a ET, outros autores avaliaram uma variação do protocolo proposto por Field e cols, sem a EC, e concluíram que utilizando o protocolo completo o ganho de peso foi maior²³. Outro parâmetro avaliado em 2005 foi a pressão aplicada durante a ET, demonstrando que a pressão moderada parece ter maior efeito do que o uso da pressão leve.^{17,24} Além disso, foi constatado um aumento da motilidade gástrica neste grupo, o que sugere que tais achados poderiam explicar o maior ganho de peso devido ao aumento da motilidade gástrica, avaliada pelo método eletrogastrografia.²⁵ Hernandez-Reif e cols. em 2006 identificaram, também, que o grupo de RN que recebeu ETC com pressão moderada apresentou menos sinais comportamentais relacionados ao estresse, como diminuição da frequência cardíaca, maior tempo de sono profundo e menor frequência de sinais relacionados ao estresse como choro, soluço, sono agitado e movimentação corpórea (segundo a escala de Thoman²⁶), sugerindo que a ETC é procedimento relaxante.²⁷ Os autores sugeriram que o maior relaxamento se associaria à menor gasto energético e consequente maior ganho de peso. A favor desta ideia, existe um estudo que encontrou menor gasto energético em RN que receberam a ETC em comparação com período sem ETC, avaliado por meio de calorimetria indireta.²⁸

Em 1996, foi realizado um ensaio clínico em 60 RN a termo com um mês de vida, onde o cortisol salivar foi dosado com o objetivo de verificar se a massagem poderia diminuir o estresse. Nesse estudo, um grupo recebeu massagem com óleo e outro massagem sem óleo, e observou-se que o grupo com óleo teve maior diminuição dos comportamentos estressantes (como choro, sustos, movimentos irregulares e bruscos dos membros), assim como queda dos níveis de cortisol salivar.²⁹ Essa queda dos níveis de cortisol também foi observada em 2007, num estudo feito com RN pré-termo que receberam 5 dias de massagem.²⁶

Em 2008, um grupo de autores avaliou a temperatura dos RN que receberam a ETC na incubadora, para testar a evolução da temperatura corporal durante o procedimento.³⁰ Foi observado que os RN que receberam a ETC tiveram aumento significativo da temperatura corporal no período durante e após o procedimento, afastando a preocupação com a hipotermia pela abertura prolongada da incubadora.

Os benefícios já observados com a aplicação da ETC são vários, porém, mesmo procedimentos aparentemente inócuos ou até tido como prazerosos, necessitam de uma avaliação quanto à segurança, antes de sua implantação nas unidades neonatais. A massagem é proposta como um meio de reduzir o impacto negativo sobre o RN e sua família.³¹

A avaliação do cortisol salivar após a aplicação da ETC nos fornece dados importantes quanto à segurança desta técnica aplicada em RNPT internados na UTIN, além da possibilidade de diminuição do estresse nesta fase.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Comparar os níveis de cortisol salivar, bem como alterações da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e saturação de oxigênio (Sat O₂) pré- e pós- a aplicação de ETC em RNPT, com peso ao nascer menor ou igual a 2.000g e idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, durante o período de internação em UTIN, verificando a efetividade e segurança da técnica.

Objetivos Específicos

- 1- Comparar o nível de cortisol no tempo, antes e após 30 min do procedimento, intra- e intergrupos.
- 2- Comparar a FC, FR e Sat O₂ em quatro tempos: antes da primeira coleta de saliva, imediatamente antes de iniciar a ETC/troca decúbito, imediatamente depois da ETC/troca decúbito e após o término da segunda coleta de saliva), intra- e intergrupos.
- 3- Comparar temperatura corpórea em três tempos: antes da primeira coleta de saliva, imediatamente após a ETC/troca decúbito e após o término da segunda coleta de saliva), intra- e intergrupos.

SUJEITOS E MÉTODOS

Desenho do estudo

O estudo feito foi um ensaio clínico randomizado, controlado e cego. A randomização foi feita em bloco.

Tamanho Amostral

Para o cálculo do tamanho amostral, a média e desvio padrão dos níveis basais foram estimados a partir dos valores da mediana, mínimo e máximo, obtidos no estudo *Influence of prone positioning on premature newborn infant stress by means of salivary cortisol measurement: pilot study*. Considerando um nível de 5% de significância e um poder de 80% seriam necessários, no mínimo, 17 RN para mostrar que há diferença no nível de cortisol quando comparado o nível basal com pós- posição prona.

Variáveis

Variáveis dependentes

- **Frequência respiratória:** Número de incursões respiratórias contadas em um minuto, durante o exame clínico, por intermédio da inspeção, avaliada em 4 tempos: antes da primeira coleta de saliva, imediatamente antes de iniciar a ETC/troca decúbito, imediatamente depois da ETC/troca decúbito e após o término da segunda coleta de saliva.

- **Frequência cardíaca:** Número de batimentos cardíacos por minuto, avaliados através do oxímetros de pulso Dixtal® DX-2405 ou Ohmeda®-3700. A FC também será observada em 4 tempos: antes da primeira coleta de saliva, imediatamente antes de iniciar a ETC/troca decúbito, imediatamente depois da ETC/troca decúbito e após o término da segunda coleta de saliva.
- **Saturação de oxigênio:** A SatO₂ será avaliada pelos oxímetros de pulso Dixtal® DX-2405 ou Ohmeda®-3700, também nos mesmos 4 tempos: antes da primeira coleta de saliva, imediatamente antes de iniciar a ETC/troca de decúbito, imediatamente depois da ETC/troca decúbito e após o término da segunda coleta de saliva.
- **Temperatura corpórea:** Medida da temperatura axilar com termômetro digital, realizada antes da primeira coleta de saliva, imediatamente após a ETC/troca decúbito e após o término da segunda coleta de saliva, somente para assegurar que o RN não teve queda da temperatura corporal por manter a incubadora aberta.
- **Dosagem do cortisol salivar:** A dosagem hormonal quando realizada através da saliva determina a concentração do hormônio pesquisado em sua forma livre, medido em µg/dL (micrograma por decilitro). Foram feitas duas coletas para medição, pré e pós 30 min do término da ETC/troca de decúbito.

Variáveis Independentes

- **Estimulação tátil e cinestésica (ETC):** Consiste em três fases padronizadas com duração de 5 minutos (min) cada fase. A primeira e a terceira fase são de Estimulação Tátil (ET) e a fase intermediária é composta pela Estimulação Cinestésica (EC). A ET foi realizada com o RN em prono, e são feitos deslizamentos pelo corpo nas seguintes regiões: cabeça, pescoço e ombros, costas, membros inferiores e membros superiores. Na fase de EC o RN foi colocado em supino e são realizados movimentos de flexão e extensão de cada membro, um membro por vez e por último com os membros inferiores juntos. O grupo controle não recebeu a intervenção, porém foi feita a mudança de decúbito no tempo semelhante a que acontece com o grupo que recebe a ETC.

Variáveis Descritivas

- **Peso ao nascer:** peso, em gramas, obtido na sala de parto imediatamente após o nascimento e o peso do dia do procedimento, ambos obtidos através do prontuário.

- **Idade gestacional:** estimativa duração da gestação, em semanas completas, avaliada pela data da última menstruação (quando confiável) ou pelo método de Ballard modificado.³² Esta informação foi coletada no prontuário médico.
- **Adequação do peso para a idade gestacional:** estabelecida utilizando a curva de crescimento intrauterino de Alexander (1996)³³, obtida no prontuário. Foi categorizada em: AIG- peso ao nascer entre P10 e P90, PIG- peso ao nascer < P10, GIG- peso ao nascer > P90.
- **Sexo:** masculino ou feminino segundo as características da genitália externa.
- **Idade pós-natal:** quantos dias de vida no dia do procedimento.
- **Uso de cafeína:** foi anotado se o RN estava recebendo cafeína.
- **Mãe usuária de droga:** se a mãe fez uso de drogas (como álcool, cigarro, maconha) antes ou durante a gestação. Dado coletado no prontuário do paciente.
- **Intercorrências durante a intervenção:** foram anotadas as intercorrências que ocorreram durante os 15 min da intervenção ou durante a coleta das amostras de saliva como taquicardia (FC>180 bpm), bradicardia (FC<80 bpm), dessaturação (SatO2 <80%).
- **Uso de fototerapia:** considerada se suspensa há menos de 5 dias da intervenção.
- **Sucção não nutritiva:** dado colhido no prontuário, se o RN fez sucção não nutritiva no dia anterior à intervenção.
- **Sucção nutritiva:** dado colhido no prontuário, se o RN fez sucção nutritiva no dia anterior à intervenção.

Seleção dos sujeitos

Foram selecionados para este estudo todos os RN pré-termo com peso ao nascer menor ou igual a 2.000g e idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, que estavam clinicamente estáveis, em ar ambiente, em incubadora ou berço aquecido, durante período de internação no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM)/Unicamp.

Crítérios de Inclusão

Foram incluídos os RNPT com peso ao nascer menor ou igual a 2.000g e idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, com 100% da oferta láctea via oral ou por sonda oro/nasogástrica (intermitente ou bolus), internado na unidade de cuidados intermediários, em

ar ambiente, ausência de venóclise e sem intercorrências clínicas há pelo menos 5 dias. Quadros de apneia ou dessaturações não foram considerados como intercorrências.

Crítérios de Exclusão

Foram considerados como exclusão os seguintes diagnósticos ou situações: síndromes genéticas, malformações congênitas, alimentação contínua por sonda ou transpilórica, infecções congênitas, fraturas, uso de medicamentos (miconazol oral e corticóide), lesões descamativas de pele, asfixia perinatal, hemorragia perintraventricular grau III e IV, hérnia inguinal com indicação cirúrgica, berço comum (pois o RN deveria estar apenas usando fralda para realização da intervenção), alta/transferência antes de completar os 5 dias de estabilidade.

Para a inclusão/exclusão de cada caso, uma lista de checagem dos critérios foi preenchida pelo pesquisador principal (ANEXO 1)

Crítérios de Descontinuação

O procedimento seria descontinuado caso ocorresse alterações cardiorrespiratórias como (FC >180bpm ou < 80 bpm; FR > 60ipm e SatO₂ < 86%) durante a intervenção, choro intenso ou qualquer sinal de desconforto importante para o RN, que não tivesse retorno rápido e espontâneo.

Instrumento para coleta de dados

Uma ficha desenhada para a coleta das informações (ANEXO 2) foi preenchida pela pesquisadora principal, durante a coleta.

Coleta de dados

Os sujeitos foram selecionados pela análise do prontuário e preenchimento da lista de checagem (ANEXO 1). Aqueles que preencheram os critérios de inclusão foram incluídos seguindo uma tabela de randomização gerada em computador, pela estatística da FCM/UNICAMP. Envelopes pardos sequencialmente numerados continham em seu interior a sequência de randomização identificando a qual o grupo o RN pertenceria, grupo caso ou grupo controle, os quais foram abertos apenas no dia do procedimento.

O procedimento foi feito sempre 1 hora após a primeira mamada da manhã (aproximadamente as 5h/6h). Este período foi estabelecido pois os procedimentos de rotina da UTI Neonatal do Hospital do CAISM iniciam-se a partir das 8h, evitando desta forma manuseio excessivo dos RN, além de garantir um ambiente tranquilo, com menor interferência de outros procedimentos sobre a ETC e sobre a coleta da amostra de saliva. Ademais, durante a madrugada a rotina dos RN é semelhante, diminuindo as chances de eventos estressantes que pudessem interferir nos níveis de cortisol. A segunda coleta do cortisol foi feita após 30 min, pois o pico do cortisol acontece de 20 a 40 min pós-estímulo.

A ETC seguiu o protocolo proposto pela Dra. Field em 1986 e foi aplicada pela pesquisadora, que é fisioterapeuta e fez o treinamento com a equipe da Dra. Field, no *Touch Research Institutes – University of Miami* (ANEXO 3).

Em ambos os grupos a sequência para a coleta de dados foi a seguinte:

- 1) Separação cuidadosa do material a ser utilizado: material de coleta (*swab* e tubo coletor eram colocados em um recipiente térmico rígido de 5 litros, com placas de gelo rígidas congeladas para o transporte da saliva desde a UTIN até o laboratório de análises clínicas, termômetro, cronômetro, luvas, vaselina líquida, fichas de coleta de dados.
- 2) Fazia-se a medição da temperatura, da FR e anotava-se a FC e SatO₂ disponíveis no monitor.
- 3) Coleta da saliva: o *swab* era introduzido na cavidade oral do RN e mantido por cerca de 10 min. O *swab* era dobrado e colocado dentro no tubo coletor, e transportado ao laboratório na caixa térmica. Esse material era deixado na centrífuga a 4°C até a segunda amostra ser coletada.
- 4) Antes de iniciar a ETC/troca de decúbito, anotava-se novamente a FR, FC e Sat O₂. No grupo intervenção: A fisioterapeuta aplicava a ETC e depois deixava o RN em decúbito ventral (DV) por 30 min. No grupo controle: A fisioterapeuta aplicava a sequência de mudanças de decúbito (primeiros 5 min em DV, depois 5 min em decúbito dorsal DD, e finalmente os últimos 5 min em DV). Da mesma forma, o RN permanecia em DV por 30 min após o término do procedimento.
- 5) Terminada a ETC/troca de decúbito, fazia-se a medição de Temperatura, FR, FC e Sat O₂.
- 6) Após 30 minutos do término da intervenção, era feita nova coleta de saliva. Após a segunda coleta, nova medição de temperatura, FR, FC e Sat O₂.

7) A segunda amostra era transportada para o laboratório, aonde, juntamente com a primeira amostra, era feita a centrifugação do material. Após centrifugação, descartava-se a parte aonde fica o *swab*, e armazenava-se imediatamente a saliva à -80°C no mesmo laboratório.

8) O material ficou armazenado até 21 de março de 2017, quando foi retirado pela pesquisadora, cuidadosamente colocando as caixas das amostras dentro de caixas térmicas com gelo seco e entregue aos responsáveis do Laboratório da Science Pro, os quais fizeram o transporte do material até o laboratório aonde seria realizada a dosagem do cortisol, São Caetano do Sul, São Paulo, SP.

Intervenção

A ETC proposta foram 3 fases padronizadas com duração de 5 min cada fase - estimulação tátil durante a primeira e a terceira fases e estimulação cinestésica durante a fase intermediária. Utilizou-se vaselina líquida para auxiliar no deslizamento da mão do terapeuta sobre a pele do RN. A pressão utilizada para a fase tátil foi moderada, dosada pela mudança ligeira de cor da pele do branco ao rosa, ou por recuos ligeiros na pele do RN. Foram massageados por 5 períodos de 1 min ao longo de cada região (contando da seguinte forma: 5 segundos ida e 5 segundos volta de cada região, repetindo por 6 vezes, o que resulta em 60 segundos em cada região), na seguinte sequência:

- 1) a partir do topo da cabeça até o pescoço e volta para o topo da cabeça;
- 2) a partir do pescoço para os ombros e volta para o pescoço;
- 3) a partir da parte superior das costas até a cintura e de volta à parte superior das costas;
- 4) a partir da coxa até o pé e volta para a coxa, em ambas as pernas e
- 5) a partir do ombro até a mão e volta para o ombro, em ambos os braços.

Durante a fase de estimulação cinestésica, o RN foi colocado em supino e recebeu 6 movimentos passivos de flexão (5 segundos) e extensão (5 segundos) dos membros, sendo 1 minuto para cada braço e cada perna, e, finalmente, nas duas pernas juntas (5 minutos no total). Em seguida, o RN foi colocado novamente em decúbito ventral para receber a terceira fase (estimulação tátil), exatamente como a primeira fase.¹³

Grupo controle

O grupo controle recebeu a troca de decúbito, aplicada na mesma sequência que ocorria no grupo que recebeu a intervenção (5 min em DV, 5 min em DD e mais 5 min em DV). Em seguida, ambos os grupos permaneceram por 30 min em DV.

Dosagem do cortisol

Para determinar o material que seria utilizado na coleta da saliva, foi realizada uma pesquisa para verificar a disponibilidade do material no mercado. Optamos por adquirir o material da empresa Science Pro, que possui laboratório em São Caetano do Sul, São Paulo, SP e que representa a Salimetrics no Brasil (Pensilvânia EUA). A Salimetrics produz o *SalivaBio Infant's Swab*[®] (SIS) que é um *swab* com tamanho menor, especialmente desenvolvido para crianças menores de 6 meses. O mesmo laboratório realizou a dosagem do cortisol, com Kit de Cortisol de alta sensibilidade, também da Salimetrics, utilizando método ELISA. Foi feito contato com a empresa, com a responsável pelo laboratório, que nos auxiliou quanto aos prazos de validade, dados de centrifugação e modos de armazenamento da saliva, seguindo os padrões propostos pelo fabricante.

A coleta da saliva foi realizada antes da intervenção e 30 min após o término do procedimento, em ambos os grupos, utilizando o *SalivaBio Infant's Swab*[®] (SIS). O *swab* permaneceu dentro da boca dos RNPT por 10 min, tanto na coleta pré- quanto na coleta pós-, foram feitos leves movimentos circulares, percorrendo toda a mucosa oral. O *swab* foi colocado imediatamente após a coleta da saliva no *Swab Storage Tube*, também da marca Salimetrics (o qual possui um compartimento que separa a saliva do *swab*, sendo que após a centrifugação, a parte aonde fica o *swab* é descartada), devidamente etiquetados com HC e nome da mãe/ou RN e se era a coleta pré- ou pós-. O material de coleta era levado para centrifugação no laboratório de análises clínicas do CAISM - UNICAMP. A primeira amostra era colocada na centrífuga e ficava armazenada à 4^oC por mais ou menos uma hora, até que a segunda amostra fosse coletada (tempo para realização do procedimento somado aos 30 min pós- intervenção e mais 10 min da segunda coleta). Após a segunda coleta de saliva, a amostra era levada imediatamente ao laboratório e, junto com a primeira amostra, eram centrifugadas. Utilizou-se a *Eppendorf Centrifuge 5810R*, à 3500rpm por 15 min e imediatamente após centrifugação as amostras eram colocadas em caixas próprias e armazenadas à -80^oC, no ULT Freezer -86^o, também no Laboratório de Análises Clínica do CAISM- UNICAMP. A coleta foi realizada no período de junho de 2016 até março de 2017, respeitando o tempo de validade do kit de coleta. Para a dosagem, utilizou-se o Método de Elisa do tipo competitivo, com o seguinte procedimento: foi

pipetado 25ul dos calibradores (3,0; 1,0; 0,333; 0,111; 0,037; 0,012) e 25ul das amostras na placa de Elisa, em seguida foi pipetado o conjugado em todos os poços. Incubou-se a placa por 1 hora no agitador a temperatura ambiente, seguido de lavagem da placa (4 ciclos com solução de lavagem), foi adicionado 200ul de substrato em todos os poços, foi feita incubação de mais 25 min, depois a adição de 50ul da solução STOP e finalmente leitura da placa em 450nm (dados fornecidos pelo laboratório Science Pro que realizou tal procedimento).

CONTROLE DE QUALIDADE

Um projeto piloto foi realizado, na forma de ensaio clínico randomizado e controlado, aplicando a ETC em 10 RN pré-termo nascidos com peso menor ou igual a 1500g, internados na UTIN do CAISM- Unicamp, estáveis há pelo menos 10 dias. A ETC foi realizada 1 vez por dia, durante 5 dias seguidos em cada RN, e foram avaliados: peso, tempo de internação, frequência cardíaca, frequência respiratória, saturação de oxigênio e temperatura, e todos os atendimentos foram filmados para posterior avaliação comportamental. Durante esse período, observou-se as intercorrências que aconteceram durante a aplicação do procedimento e os ajustes necessários foram feitos na metodologia para que houvesse padronização na forma de aplicação.

A intervenção foi feita sempre pela mesma terapeuta, que foi treinada pela equipe da Dra. Field, no Touch Research Institutes – University of Miami, em agosto de 2011.

A quantidade de vaselina líquida utilizada para o procedimento variou entre 3 a 5 gotas por paciente, sendo colocada nas mãos do terapeuta e não diretamente na pele do RN.

O laboratório que realizou a dosagem do cortisol, assim como os responsáveis pelo cálculo estatístico, o fizeram de forma cega, não sabiam qual grupo, 1 ou 2, havia recebido intervenção, nem mesmo qual era a intervenção que estava sendo estudada.

PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Após o preenchimento da ficha de coleta de dados, foi feita uma verificação manual de seu preenchimento e na sequência a digitação das informações em banco de dados em EXCEL. A verificação da digitação e consistência das informações digitadas foi realizada por

conferência manual com as fichas. Uma tabela foi enviada ao laboratório da Science Pro, uma coluna com os nomes das mães/RN (como constava nas etiquetas anexadas aos tubos com a saliva), e uma coluna identificando se pertenciam ao grupo 1 ou grupo 2 (sem especificar qual grupo era caso ou controle), e mais duas colunas em branco para preenchimento do laboratório com os valores das dosagens pré- e pós-.

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas, com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo e mediana.

Para comparação das variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Para comparação das variáveis numéricas, dados basais das variáveis foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para comparação entre os tempos e grupos das variáveis Cortisol, FC, FR, Sat O₂ e temperatura foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas. Os dados foram transformados em postos (*ranks*). O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi devidamente apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP, com registro na Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC {<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>} CAAE 44635015.0.0000.5404.

A proposta do estudo foi apresentada aos pais/responsáveis, em momento oportuno, durante a visita ao RN na unidade neonatal, esclarecendo todas as possíveis dúvidas. A mãe pôde levar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para casa, à fim de consultar os demais membros da família. Todos os TCLE foram assinados pelos responsáveis (ANEXO 4) e a ela foi entregue uma via deste documento, segundo a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de 2 artigos de revisão sistemática, e 1 artigo referente ao ensaio clínico realizado.

Artigo 1: *Application of Tactile/Kinesthetic Stimulation in Preterm Infants: A Systematic Review*, publicado em 2015 no Jornal de Pediatria, Ref. No.: JPED-D-14-00386.

Artigo 2: *Methodology used for collecting saliva of preterm newborns to measure cortisol: systematic review*, aceito no Current Pediatrics Research, em Junho de 2017, reference number: 0971-9032-21-430.

Artigo 3: *Dosagem de cortisol salivar pré e pós-estimulação tátil e cinestésica em recém-nascidos pré-termo: ensaio clínico randomizado e controlado.*

Artigo 1

***Application of Tactile/Kinesthetic Stimulation in Preterm Infants:
A Systematic Review***

ABSTRACT

Objective: Verified the methods used by the clinical trials that assessed the effect of tactile/kinesthetic stimulation on weight gain in preterm infants and highlighted the similarities and differences among such studies. **Sources:** This review collected studies from two databases, PEDro and PubMed, in July 2014, besides bibliographies. Two researchers assessed the relevant titles independently, and then chose by consensus which studies to read in full and include in this review. The clinical trials that studied tactile stimulation or massage therapy associated or not with kinesthetic stimulation to preterm infants, assessed weight gain after the intervention, had a control group and were written in English, Portuguese or Spanish were included. **Summary of findings:** Total of 520 titles was found and 108 were selected for manuscript reading. The repeated studies were excluded, resulting in 40 different studies. Of these, 31 met all the inclusion criteria. There are many differences in the application of techniques tactile/kinesthetic stimulation among studies, which hinders the accurate reproduction of the procedure. Also, many studies didn't describe the adverse events that occurred during stimulation, the course of action taken when such events occurred, and their effect on the outcome. **Conclusions:** These studies did a relevant contribution adding to place tactile/kinesthetic stimulation as a promising tool. Nevertheless there was no standard for application among them. Future studies may raise the level of methodological rigor and describe the adverse events. This may permit other researchers to be more aware of what to expect, and a standard technique could be established.

Key Words: Preterm infants, massage, review, weight gain, tactile/kinesthetic stimulation

Aplicação da estimulação tátil-cinestésica em neonatos prematuros: revisão sistemática

RESUMO

Objetivo: Verificar quais metodologias foram usadas por ensaios clínicos que avaliaram o efeito da estimulação tátil-cinestésica sobre o ganho de peso de neonatos prematuros e destacar as diferenças e semelhanças entre esses estudos. **Metodologia:** Esta análise coletou estudos de duas bases de dados, Pedro e PubMed, em julho de 2014, além de bibliografias. Dois pesquisadores avaliaram os títulos relevantes independentemente e, então, escolheram consensualmente quais estudos seriam lidos na íntegra e incluídos nesta análise. Foram incluídos os ensaios clínicos que estudaram a estimulação tátil ou a massagem terapêutica associada ou não à estimulação cinestésica em neonatos prematuros e avaliaram o ganho de peso após a intervenção, que tivessem grupo de controle e foram escritos em inglês, português ou espanhol. **Resultados:** Foram encontrados 520 títulos e foram selecionados 108 para leitura. Os estudos repetidos foram excluídos, o que resultou em 40. Desses, 31 atenderam a todos os critérios de inclusão. Há muitas diferenças na aplicação das técnicas de estimulação tátil-cinestésica entre os estudos, o que prejudica a reprodução precisa do procedimento. Além disso, muitos estudos não descreviam os eventos adversos ocorridos durante a estimulação, o que era feito quando tais eventos ocorriam e seu efeito sobre o resultado. **Conclusões:** Esses estudos fizeram uma contribuição relevante ao incluir a estimulação tátil-cinestésica como uma ferramenta promissora. Contudo, não houve padrão de aplicação entre eles. Estudos futuros podem aumentar o nível do rigor metodológico e descrever os eventos adversos. Isso permitirá que outros pesquisadores tenham mais ciência do que esperar e assim estabelecer uma técnica padrão.

Palavras chave: prematuro, massage, revisão, ganho de peso, estimulação tátil e cinestésica.

INTRODUCTION

Preterm infants (PI) are exposed daily to many stressors in the neonatal intensive care unit (NICU) inherent to the critical care they need to survive. The manner and intensity of exposure vary according to the individual PI condition and response. It has already been shown that this exposure leads to structural and functional changes in specific areas of the brain, affecting its development¹, language, social-emotional and adaptive-behavior².

Tactile stimulation (TS) or massage therapy (MT), sometimes associated with kinesthetic stimulation (KS), is used in PI along with the standard clinical treatment. TS have been the object of clinical studies since the 1960s³, when it was proposed as a means of encouraging PI growth and development³⁻¹⁰. Additionally, recent studies show that interventions such as tactile/kinesthetic stimulation (TKS) have the added benefit of reducing behavioral manifestations of stress¹¹.

The objective of this systematic review was to verify which methodologies were used by clinical trials that study the effects of some type of TS/MT associated or not with KS on weight gain of PI. We choose clinical trials that studied the effects on weight gain, as this is a determinant variable for discharge from the NICU. The differences and similarities between the methods used by the reviewed clinical trials were highlighted in an attempt to improve the methodological quality of future trials.

METHODS

Two databases were searched for this systematic review: the Physiotherapy Evidence Database (PEDro) at <www.pedro.fhs.usyd.edu.au>, searched on July 17, 2014¹² and the United States National Library of Medicine of the National Institutes of Health (PubMed) at <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, searched on July 17, 2014¹³. All studies listed on that date were included.

The PEDro database was searched by specifying the following fields in the advanced search option: therapy (stretching, mobilization, manipulation, massage); subsdiscipline (pediatrics) and method (clinical trial).

PubMed was searched using 6 keyword combinations as follows:

Search 1: massage premature newborn

Search 2: tactile kinesthetic stimulation premature

Search 3: tactile stimulation premature

Search 4: massage premature growth

Search 5: kinesthetic stimulation premature growth

Search 6: tactile kinesthetic stimulation premature growth

In addition to these searches, the references of the chosen articles were also checked, and another 12 relevant articles were selected for evaluation.

INCLUSION CRITERIA

Two independent researchers according to their titles preselected the articles. In case of doubt, the article was included in the selection process by consensus. The preselected titles were then stored in a file according to the database they were found and their abstracts or texts were downloaded for assessment. Once downloaded, the articles were thoroughly read to select those that met the inclusion criteria detailed below.

The present review included all clinical trials, that studied the provision of TS or MT associated or not with KS to PI in NICU, assessed PI weight gain after the intervention, had a control group that did not receive any intervention in addition to the standard treatment provided by the NICU, and were written in English, Portuguese, or Spanish.

RESULTS

A total of 508 articles were found in the two abovementioned databases. Seventeen articles were fully read among the 206 articles found in the PEDro database, of which eight met the inclusion criteria. The first search on PubMed resulted in 126 titles, of which 30 were selected and 18 met the inclusion criteria. The second search on PubMed resulted in 16 titles, of which 10 were selected and eight met the inclusion criteria. The third search on PubMed resulted in 86 titles, of which 14 were selected and ten met the inclusion criteria. The fourth search on PubMed resulted in 49 titles, of which 23 were selected and 16 met the inclusion criteria. The fifth search on PubMed resulted in 14 titles, of which nine were selected and six

met the inclusion criteria. The sixth search on PubMed resulted in 11 titles, of which eight were selected and five met the inclusion criteria.

However, another 12 titles found in the references of the articles that met the inclusion criteria were analyzed, and of these, four were included, five were excluded, and three were not found. Table 1 shows the titles and where they were found.

In summary, 520 titles were found, the repeated studies were eliminated, resulting in 31 that met the inclusion criteria of the present review (Table 1).

TS/MT was done in many different ways^{3,9,10,14-18} and the most of the studies didn't provided a detailed description of how to proceed during the stimulation if adverse events occur, nor of the possible effects of these events on the outcomes.

Analysis of the techniques used by different studies showed that older studies, such as Solkoff⁶, Kramer⁷, and Solkoff & Matuszak⁸ did not specify which parts of the body were stimulated or how often. The pressure used during the intervention and its duration varied greatly between these studies.

White & Labarba³ were the first to combine TS and KS. In 1981, Raush⁹ divided TKS into three phases of five minutes each and applied TKS only when PI was awake, without changing their position in the incubator. Both Lee¹⁹ and Ferreira & Bergamasco²⁰ followed these procedures. Raush⁹ suggested that new studies should provide the intervention for at least 10 days, because weight gain increased after this period. Raush's⁹ study was the first to show significantly faster weight gain in PI submitted to TKS and to describe the used technique in detail.

Scafidi & Field²¹ standardized the three five-minute phases proposed by Raush⁹ into prone TS + supine KS + prone TS. Fourteen of the 31 studies that met the inclusion criteria for the present review used the technique described by Field¹⁰ in 1986; eleven of the 14 were done by Field's team^{10,21-30} in the same institution and three were done by other researchers, namely Lee¹⁹, Massaro³¹, and Ang³². The intervention was usually done after the first feeding in the

morning. In 1990, Field²⁴ provided the intervention at the beginning of three consecutive hours, after the midday feeding.

Mathai¹⁴ introduced a new way of providing TKS as follows: the intervention was done after the morning, midday, and evening feeding in the prone (TS) + supine (TS) + supine (KS) positions, which was repeated by Arora³³. Like other studies, they also used some type of oil to reduce friction on the PI's skin.^{14,17,33-35} In some studies, only the mothers provided KTS.^{16,35,36}

Ferber¹⁵ suggested that during the first 10 seconds of TS, the caregiver should only rest his hand on the PI, avoiding movements.

Dieter²⁷ was the first to provide TKS for only 5 days, showing that this is enough to increase the rate of weight gain significantly compared with the control group.

Diego²⁸ demonstrated that moderate KTS pressure promoted better outcomes than placebo that received light KTS pressure. Also, in another time trained a few therapists and suggested that the technique was effective, regardless of therapist.²⁹

Massaro³¹ tested KTS and TS separately in different groups of infants and found that KTS appears to be better, but the difference was not significant.

Fucile & Gisel¹⁸ used the same trained researcher to provide the intervention and introduced oral stimulation (OS) in addition to KTS. They found that OS did not increase the rate of weight gain and attributed this result to the shorter period dedicated to each intervention, suggesting that the duration of the sensoriomotor input is critical for improving defined outcomes.

Ferreira & Bergamasco²⁰ used gentle techniques with no rigid sequence, only when the PI was awake.

Moyer-Mileur³⁷ used the Infant Massage USA protocol, but he modified for PI eliminating massage the abdomen.

Kumar³⁴ demonstrated that PI that received oil massage soon after birth had lesser weight loss in the first week, probably because insensible water loss through the skin due to blockage of pores sweat glands. Also, early oil application probably causes better temperature regulation and less calorie expenditure due to cold stress.

Abdallah³⁵ used TS without KS didn't find greater weight gain, but the pain scores on the Premature Infant Pain Profile were favored in the massaged infants, being lower after the intervention and at discharge, in addition to better cognitive scores.

DISCUSSION

Tactile stimulation has advantages of being noninvasive, inexpensive and safe, like was demonstrated by Livingston³⁸ based on physiological stability and no change in agitation/pain scores of the infants receiving massage. The majority of the clinical trials studied herein (20 of the 31 studies)^{3,10,14,15,17,18,19,21-32,34} described a significantly benefit on weight gain in the PI group that received the TS/TKS. This information place TS as a promising adjunctive tool in addressing the PI in NICU. Some of the studies did not assess the data statistically, and part of them justified that because of small sample size.^{6,7,8}

Some correlations have been suggested to justify the faster weight gain of PI submitted to TKS, such as greater vagal stimulation and gastric activity^{28,29}; relationship with energy intake^{3,10,15,17,22-31,39}, sleep-wake behavior and behavioral scales^{6,7,8,10,14,19-27,36,39}, serum insulin and IGF-1 levels^{30,37} and use of oil^{33,40,41}. The results found by Diego²⁸ and Field⁴² on the effects of mild and moderate pressure showed that moderate pressure provided greater vagal stimulation. Diego²⁹ also found greater gastric motility among the PI who were stimulated with moderate pressure and suggested that greater gastric activity may explain their faster weight gain. Field et al⁴² added that the group of PI stimulated with moderate pressure were more relaxed, characterized by their lower heart rates and by the assessment of their wake and sleep status, and behavior, as recommended by Thomas Scale 1975^{Apud 21}. They then suggested that the more relaxed state of the PI resulted in lower energy expenditure, which would then result in faster weight gain. This was confirmed by Lahat et al⁴³, when they used indirect calorimetry to show that a group of PI submitted to stimulation had lower energy expenditure.

Regarding energy intake, some studies have shown that stimulated infants have higher

daily weight gain^{10,17,22,23,25-28,31,32,39}. Other studies recorded stooling frequency and found that it increased significantly, together with an increased formula intake on days 6-10⁹. Raush⁹ suggested that increased stooling was a consequence of higher formula intake. On the other hand, Scafidi et al²³ found that the frequency of stooling decreased, even when daily weight gain increased. White & Labarba³ reported that the amount of formula consumed per feeding increased while the number of daily feedings decreased, which the authors attributed to the nursery routine: PI who did not consume the entire serving were fed more often. Other studies that reported faster weight gain did not find significant differences in energy intake.

Along with weight gain, other variables, some mentioned above, have been analyzed after application of TKS in premature. All following parameters were analyzed by clinical studies in PI who received TS/MT associated or not with KS during their NICU stay, weight gain^{3,6-10,14-37,39}; length of hospital stay^{10,16,17,20,21,23,24,28,31,32,35,37,39}; behavioral responses^{6-8,10,14,19-23,25,26,36,39}; sleep/wake stage^{10,21,23,24,26,27}; stress behavior¹¹; energy expenditure⁴³; body temperature^{3,6,21,23-26,44}; variations in stimulation pressure⁴²; use or not of oil^{33,40,41}; speed of brain maturation³⁸; vagal activity and gastric motility^{28,29}; serum insulin and growth factor I levels^{30,37}; late-onset sepsis¹⁶; body fat deposition³⁷; effect on the immune system³²; bone formation⁴⁵. The studies had very similar objectives, that is, to identify the effects of TKS on these parameters and the possible causes of its benefits.

Some studies using only KS obtained results not only on greater weight gain but also in bone mineralization^{46,47,48}. As for TKS with or without KS for bone weight gain analyzed herein, they found that there is no ideal level of stimulation⁴⁷ or optimal duration, frequency and type of exercise for bone development⁴⁹. Further evaluation of this intervention (KS) was suggested to indicate for this purpose⁵⁰. A more recent study demonstrated a significant improve in bone formation and decrease of bone resorption, using a more proper methodological design.⁴⁸

A few studies described the adverse situations that could occur during the procedure and the parameters that should encourage the therapist to interrupt the session^{14,18,19,26,33}. Certain signs during the application of the TKS, such as stress or uninterrupted crying for more than 60 seconds²⁶; defecation, urination¹⁴; increased heart rate^{19,27} or heart rate <100 for 12 seconds and desaturation for more than 30 seconds¹⁹, were some of the causes that made the therapists interrupt the procedure or discontinue the study. Some therapists considered some signs in the

24 hours that preceded the intervention to suspend the procedure as fussing, vomiting, growing oxygen demand, frequent episodes of apnea, bradycardia, desaturation or interventions done within the 30 minutes that preceded TKS, such as sight and hearing tests¹⁸. Arora³³ separated the adverse situations into temporary interruption and minor problems that neither affected their feeding nor required any interruption in the trial.

Despite the information above, the majority of the studies does not mention about adverse events and/or does not describe a course of action to deal with adverse events during the intervention. The studies that reported the occurrence of events that required the interruption of the procedure did not indicate how the procedure was resumed, for example, whether it was resumed from the start of the massage routine or whether it was continued from where it had stopped; also, they did not indicate whether the procedure should be resumed on the same day or on the next day, or whether these interruptions could affected weight gain. The clinical trials studied by this review did a relevant contribution on TS scope. Nevertheless adding detailed data highlighted by this review such as adverse events would improve methodology and reliability for future studies.

LIMITATIONS

This systematic review was performed using two databases, in addition to checking the bibliographic articles of those that met the inclusion criteria, however we can not rule out the possibility of not having included an article relevant to the topic that could have been found in other databases.

CONCLUSION

Assessment of the methodology of the studies reviewed herein showed that there is no standard for application of TS technique or recommended courses of action if adverse events occur during the procedure. The effect of these interurrences that can occur during the TKS procedure may influence on the results.

Generally, some kind of benefit associated with TKS, such as faster weight gain, shorter hospital stay, and better behavior, among others, was reported by all studies that used TS or TKS in PI. Nurseries have many stressors and TKS has been shown to be helpful in this context. Therefore, TKS should be considered as a possible therapy to be associated with the standard medical treatment. Even discrete gains in this population can result in long-term benefits. Future studies may raise the level of methodological rigor and describe the adverse events that can occur during the procedure. This may permit other researchers to be more aware of what to expect, and a standard TKS technique could be established.

Table 1: Description of the studies included in this review

Title/Author/ Year/Databas e	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Descriptio n of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Effects of handling on the subsequent developments of premature infants</i> ⁶ Solkoff, 1969 Bibliography of article	Total: 20 MBW=1360g MBW=1369g	Verify immediate effects e subsequent of handling on the behavior and physical developmen t 12hs after delivery, randomly assigned	5 min each hour, for 24hs, 10 days While awake, the infant's neck, back and arms were gently rubbed by a nurse or aide	1)Activity (polygraph reading, from a recorder) 2)WG 3)Temperature 4)Startle responses 5)Crying 6)Frequency of urination and defecation 7)Physical development	Body weight take daily with normal nursery routine, about the same time	Not describe	Was not done statistically because of the small sample. It seemed that TG was more active, cried less and gained weight faster
<i>Extra tactile stimulation of the premature infant</i> ⁷ Kramer M. et al., 1975 Pubmed Search 3 and PEDro	Total:14 TG:8 GAM=33w BWM=1441g CG: 6 GAM=33w BWM=1418g After the random start, subjects were alternately assigned to TG or CG.	Verify if touch like extra tactile stimulation could result in faster physical and social developmen t and a greater degree of social developmen t of PI. Beginning when the infants were at least 2 weeks in the isolletes	Gentle, nonrhythmi c stroking of the greatest possible skin area of the infant's body, by trained nurse, 48min/day- 2min before and 2min after each feeding (if 2 in 2hs) or 3min before e 3 min after (if 3 in 3hs). They use stops watches for accurate timing	1)Daily WG 2)Social (Gesell development schedule) and physical development (Bayley scale) 3)Plasma cortisol level	Body weight take daily with normal nursery routine. Scales used to weight infants were checked and calibrated once a week by the researcher s using Ohaus weights	Not describe	TG appears to have demonstrate d a more degree of motor skill
<i>Tactile stimulation and behavioral development among low- birthweight infants</i> ⁸ Solkoff and Matuszak, 1973 Pubmed search 3	Total: 11 TG: 6 GAM=31.2 w BWM=1375.3 g CG: 5 GAM=31w BWM=1564.5 g	To check the effect TS on WG and behavioral by Neonatal behavioral assessment scale. The mean age of stimulation started was 14 days	7 1/2min of extra- handling, for 10 days, in the form of stroking, during each of 16 hs/ day, total of 1.200min. Applied by 2 nurses	1)Temperamental , reflex and "early" social behavior - Neonatal behavioral assessment scale 2)WG	Not describe	Not describe	Was not done statistically because of small sample size

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>The effects of tactile and kinesthetic stimulation on neonatal development in the premature infant³</i> White and Labarba, 1976 Pubmed search 2,3,5,6	Total: 12 TG: 6 GAM=34.3w BWM=1910g CG: 6 GAM=34.2w BWM=1911g	Investigate some immediate effects such as WG, the development of low birth weight infants that received T/KS, in a typical hospital nursery. Beginning after 48hours of age	15min periods every hour for 4 consecutive hs, por 10 days. Rubbing the infant's neck, shoulder, arms, legs, chest, and back and KS. Done by researcher	1)WG, number of feedings, amount formula intake 2)Body temperature 3) HR, RR 4) Frequency of voiding and stooling	All infants were routinely weighed 3 days each week by the nursery staff.	Not describe	1) TG: more WG stimulation effect (p<0.05) and stimulation x days interaction (p<0.001) TG: More amount of formula intake (p<0.025) TG: fewer number of feedings/day (p<0.05)
<i>Effects of tactile and kinesthetic stimulation on premature infants⁹</i> Rausch, 1981 Pubmed search 2, 3, 5 e 6	Total:40 TG:20 CG:20 BW 1000-2000g Not randomized	To determine the effects of a 10-day regimen of T/KS on caloric intake, stooling, and WG. Beginning at 24-48hs of age	15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, starting 30 min after the first morning feeding, for 10 weekdays-nontreatment on weekend. Done by researcher Just with the infant awake and keepind the baby position.	1)WG 2)Number stooling 3)Caloric intake	Body weight take daily with normal nursery routine	Not describe	2)TG: Increase of formula intake on days 6-10 (p<0.0001) 3) TG: increase stooling frequency (p<0.004)
<i>Effects of tactile/kinesthetic stimulation on the clinical course and sleep/wake behavior of preterm neonates²¹</i> Scafidi and Field, 1986 Pedro	Total: 40 TG: 20 GAM=31w BWM=1280g CG: 20 GAM=31w BWM=1268g	It was designed to complement the already existing literature of the effects of T/KS in PI. Beginning when clinically stable	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, starting 30 min after the first morning feeding, for 10 weekdays-nontreatment on weekend By researcher Phase 1 e 3 in prono position and phase 2 in supine	1)Daily WG 2)Formula intake, frequency of voiding, stooling 3)HR, RR,body temperature 4)Number of apneic episodes 5)Parents visiting and touch 6) Brazelton scale 7)Sleep-wake beahvioral (Thoman's scale 1975) 8)Lenght of hospital stay	Body weight take daily with normal nursery routine	Not describe	1)TG better WG per day (8g/day more (p<0.0005) 2)More weight per calories of intake per Kg of body weight 6)TG: more mature orientation, motor habituation and range of state behaviors on Brazelton Scales 7)TG more time awake (p<0.04) and active (p<0.05) 8) TG 6 days earlier of discharged (p<0.05)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Tactile/kinesthetic stimulation effects on preterms neonates</i> ¹⁰ Field T et al., 1986 Pubmed search 2,3,5,6	Total: 40 TG:20 GAM=31 w BWM=1280g 20 GC: GAM= 31 w BWM=1268g	Evaluate the effects of T/KS on growth, sleep-wake behavior and Brazelton scale in PI Beginning when clinically stable	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, starting 30 min after the first morning feeding, for 10 weekdays-nontreatment on weekend It's not clear who apply the thechnique	1)Daily WG, formula intake, frequency of voiding and stoolong and parent visits 2)Lenght of hospital stay 3)Sleep-wake behavior 4)Brazelton scale 5)Physiological parameters	Body weight take daily with normal nursery routine	Not describe	1)TG 47% more WG per day (p<0.0005) 2) TG 6 days earlier of discharge (p<0.05) 3)TG more time awake and active (p<0.04) 4) TG: more mature orientation, motor habituation and range of state behaviors on Brazelton Scales
<i>Massage of preterm newborns to improve growth and development</i> ²² Field et al., 1987 Bibliography – Touch research institute	Total: 40 TG=20 CG=20 Overall average GA=31 weeks BW=1274g	To describe an effective massage procedure for facilitating WG in PI, reviews data that support it. Beginning when clinically stable and bottle-fed	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, starting 30 min after the first morning feeding, for 10 weekdays-nontreatment on weekend It's not clear who apply the thechnique	1)Daily WG 2)Formula intake and number of feedings 3)At the end Brazelton scale 4)At the end sleep-wake behavior – recorded for 45 min 5)After 6 months: half of the sample received rating pediatric (weight, hieght and head circumference) and Bayley scales of infant development (1969)	Not describe	Not describe	1)TG more daily WG (p<0.0005) 3) Better performed 4)More acitve 5)Greater WG after 6 months (p<0.05), better performed (p<0.05)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Databas e	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Descriptio n of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Effects of early multimodal stimulation on preterm newborn infants</i> ³⁹ Benavides- González H, Rivera-Rueda MA, 1989 Pubmed search 2,5,6	Total: 18 GAM=31.5 w BWM=1296 g GC: GAM=32.4 w BWM=1211 g	Know if the supplemental estimulation PI responses improves neurobehavior al organization, achieved greater WG and a reduction in lenght of hospital stay	Intrahospital T/KS: 15min, 2x/day, for 10 days, nontreatment on weekend Period 1: TS, vestibular and proprioceptive (15min) Period 2: lateral wedge- shaped crescent (15min) Made by 3 trained people, 30min before feeding of 7 and 10 am. Extrahospitala r: T/KS + visual, auditory stimulation for 5min	1)Daily WG 2)Formula intake 3)Lenght of hospital stay 4)Postural reflexes and neurobehaviora l performance were assessed at the time the child left the hospital and a month afterwards	Body weight take daily with normal nursery routine. They used only one scale	Not describe	1)TG 3,2g/day more 3)TG 3 days less 4) Better neurobehavior al performance and postural reflexes
<i>Massage stimulates growth in preterm infants: a replication</i> ²³ Scafidi e Field, 1990 Pedro	Total: 40 TG: 20 GAM=30w BWM=117.9 g CG: 20 GAM=30w BWM=1180 g Stratification : <or>30 weeks GA <or>1100g BW <or>20 days NICU < or > 1300g begining of study	Designed to correct previous methodologica l weaknesses and provide a replication of our previous study. Not randomized, alternative weeks. Beginning when clinically stable	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, starting 60 min after the noon feeding, for 10 weekdays- nontreatment on weekend. It's not clear who apply the technique. Never losts contact with the infant's skin during stroking motions	1)Daily WG 2)Formula intake,freque ncy of voiding, stooling 3)HR, RR, body temperature 4)Number of apneic episodes 6)Parents visiting and touch 7)Brazelton scale (day 1 e 10) 8)Sleep/wake behavior – videotaped at sitmulation/no- stimulation period 9)Lenght of hospital stay	The infant was weighed daily by the experimete r or research assistant immediately prior to the 3pm feeding	Not describe	1)TG: Greater daily WG (p<0.003) Greater WG final period – (p<0.001) 2)Frequency of stooling was lower in TG (p<0.05) 7) TG better habituation (p<0.05); motor maturity (p<0.005) e number of abnormal reflexes (p<0.001) 8)TG tactile phase: more active sleep, fewer periods without mov (p=0.001) 9) 5 days less (p<0.05)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Databas e	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measure d weight gain	Descriptio n of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Massage alters growth and catecholamine production in preterm newborns</i> ²⁴ Field and Schanberg, 1990 Bibliography – Touch research institute	Total: 40 BWM=1.176g GAM=30w NICU=14 days Randomized	To replicate the stimulation procedure and findings of the earlier study, and to add several under-the-skin variables such as growth hormone, cortisol and cathecolamine activity that might provide more information on the relationship between TS and WG	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, starting 60 min after the noon feeding, for 10 weekdays-nontreatment on weekend It's not clear who apply the technique	1)Formula intake, daily WG 2)Frequency of urination 3)Frequency of stooling 4)HR, RR,body temperature 5)Number of apneic episodes 6)Parents visiting (and if touch, holding and feeding) 7)Sleep –wake behavior 8)Plasma growth hormone and cortisol 9)Urine-norepinephrine, epinephrine, dopamine, cortisol and creatinine 10)Lenght of hospital stay	Not describe	Not describe	1)TG 21% greater WG (p=0.003). 3) better performance on the habituation cluster following the treatment period, and less time in active sleep and less facial grimacing, mouthing/yawning, and clenched fists 10) 5 days less
<i>Massage effects on cocaine-exposed preterm neonates</i> ²⁵ Wheeden et al., 1993 Pedro and Pubmed search 1, 4	Total: 30 TG GAM=29.7w BWM=1158.3g CG GAM=30.8w BWM=1265.4g	To observe the effects of MT in WG of cocaine-exposed PI Beginning when clinically stable	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, for 10 days. All made by the same researcher who was trained During phase TS never losts contact with the skin, keeping pressure even if there was some reaction from the infant tickle like	1)Daily WG 2)Formula intake,frequency of voiding, stooling 3)HR, RR,body temperature 4)Number of apneic episodes 5)Parents visiting and touch 6)Brazelton Scale 7)Postnatal complications	Body weight take daily with normal nursery routine	Not describe	1)TG greater WG 28% more 2)More daily WG, p<0.01 6)Brazelton scale: better motor maturity (p<0.005) orientation (p<0.06) and stress behaviors (p<0.05)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Factors that predict which preterm infants benefit most from massage therapy²⁶</i> Scafidi et al., 1993 Bibliography – Touch research institute	Total: 93 GAM=30 w BWM=1204g NICU=15 days Weight to start the study=1353g	This study examined individual differences to identify infant and clinical characteristics that would predict maximal WG in control and receiving MT infants. Beginning when clinically stable	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, for 10 days; never losts contact with the skin, or lightly the pressure. Research assistant or nurse trained	1)WG and volumetric and caloric intake 2)Frequency of voiding 3)HR,RR,body temperature 4)Number of apneas 5)Frequency of visiting (including touch, feeding and holding) 6)Sleep-wake 7)Brazelton scale	Data collected from the nurses notes and was daily weighted by a research assisstant	The session was discontinued if behavioral sings of stress or crying persisted for longer than 60s continuous	1)TG maior daily WG (p<0.01) 2)Separate t test analyses were performed the low and high weight gainers- 70% TG was classified as high weight gain and 40% of CG (p<0.01) Low weight gainer of the TG gained more weight (P<0.005)
<i>Effects of tactile-kinesthetic stimulation in preterms: a controlled trial¹⁴</i> Mathai S et al., 2001 Pubmed search 1,2,3,4,5,6	Total: 45 TG:25 GAM=34.6w BWM=1598g CG:23 GAM=34.3w BWM=1588g Not randomized-sistematic allocation	Determine the effects of T/KS in PI on physiological parameters, physical growth and behavioral development (Brazelton Scale). Beginning after 2 days clinically stable	T/K: 3x/day, 15 min, for 5 days, 30-45min after morning, afternoon and night feeding, by a trained professional After this period the mothers did until 40-42w post-menstrual age. Prono and supine position Use talc or mineral oil, excess removed with cotton after finish	1)Anthropometric data at the beginning and end of the study 2)Physiologic parameters 3) Brazelton scale before, after 5 days of T/KS and at the end of the study	Body weight takes daily with normal nursery routine, on an electronic weighing scale (Phillips) with an accuracy of ± 5g	If the baby started crying or passed urine or stools during the session it was temporarily stopped till the baby was comfortable again	1)TG more weight gain 21,9% = 4,24g/day 2)TG: higher HR during stimulation (p<0.005) 3)Improves neurobehavior during days 5-7 in orientation, range of state, supplements regulations and autonomic stability

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measure d weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Effects of tactile-kinesthetic stimulation in preterms: a controlled trial</i> ¹⁴ Mathai S et al., 2001 Pubmed search 1,2,3,4,5,6	Total: 45 TG:25 GAM=34.6w BWM=1598g CG:23 GAM=34.3w BWM=1588g Not randomized-sistematic allocation	Determine the effects of T/KS in PI on physiological parameters, physical growth and behavioral development (Brazelton Scale). Beginning after 2 days clinically stable	T/K: 3x/day, 15 min, for 5 days, 30-45min after morning, afternoon and night feeding, by a trained professional After this period the mothers did until 40-42w post-menstrual age. Prono and supine position Use talc or mineral oil, excess removed with cotton after finish	1)Anthropometric data at the beginning and end of the study 2)Physiologic parameters 3) Brazelton scale before, after 5 days of T/KS and at the end of the study	Body weight takes daily with normal nursery routine, on an electronic weighing scale (Phillips) with an accuracy of $\pm 5g$	If the baby started crying or passed urine or stools during the session it was temporarily stopped till the baby was comfortable again	1)TG more weight gain 21,9% = 4,24g/day 2)TG: higher HR during stimulation ($p<0.005$) 3)Improves neurobehavior during days 5-7 in orientation, range of state, supplements regulations and autonomic stability
<i>Massage therapy by mothers and trained professionals enhances weight gain in preterm infants</i> ¹⁵ Ferber SG et al., 2002 Pedro and Pubmed search 1,4	Total: 57 1)TG mother: 21 GAM=30.9 w BWM=1318g 2)TG prof: 17 GAM=31.88w BWM=1527g 3)CG: 19 GAM=31.52w BWM=1375g	Compare the results of MT done by mothers and trained professionals on WG in PI Beginning when clinically stable	Just TS prono and supine, moderate pressure, 15min, 3x/daily, early 3hs consecutive 10days. One group received from the prof, the other by mothers Each 7 1/2min: Both hands were laid on the baby's head for 10s without mov, than the infant was stroked slowlyby hand mov from the head towards the legs, back and forth. No massages on chest and stomach. Between day 7 and 9: 1 day without MT	1)WG 2)Calorie intake	Not describe	Not describe	1)TG mother and TG prof: greater WG ($p=0.03$) more evident after 5 days of interven tion

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Stable preterm infants gain more weight and sleep less after five days of massage therapy</i> ²⁷ Dieter JNI et al., 2003 Pubmed search 1,4	Total 32 TG:16 GAM=30.1w BWM=1359g CG:16 GAM=31.1w BWM=1421g	To evaluate the effect of 5 days of MT in WG and sleep-wake behavior in PI. Beginning when clinically stable	T/KS: 15min for 5 days, 3x/day. Done by a trained therapist	1)Daily WG 2)Formula intake, kilocalories, stooling 3)Sleep-wake behavior	Daily WG was measured in the early morning by nurses on the preceding night shift	At the sign of physiologic distress (HR greater than 200 bpm), massage was discontinued for 15 s, or until a return to baseline levels was observed. Massage was then resumed. The occurrence of 5 periods of physiologic overreactivity was arbitrarily chosen as the criterion for discontinuing an infant from the study. No infant discontinued.	1)TG: more 53% daily WG (p=0.001) 3)TG: less sleeping time (p = 0.04) and drowsy longer (p = 0.007)
<i>Effect of oil massage on growth and neurobehavior in very low birth weight preterm neonates</i> ³³ Arora J et al., 2005 Pedro and Pubmed search 1,4	Total: 62 1)TG with oil: 20 GAM=33.9w BWM=1280.2g 2)TG without oil: 19 GAM=34.6w BWM=1298.6g 3)CG:23 GAM=34.7w BWM=1327.1g	Studying the effect of MT with oil on growth and behavior PI with BW <1500g. Beginning as soon as they received enteral feeds of at least 100 mL/kg/day. provided they were less than ten days of age	20 gentle strokes in each area, by professionals and mothers. Prone position: both shoulders starting from the neck, upper back to the waist. Supine position: the limbs. 28 days, 4x/day per 10min. After discharge doing by mothers. Used sunflower oil	1)WG 2)Anthropometric data 3)Serum triglyceride levels	Body weight takes with normal nursery routine at the time of registration and weekly for the next 4 weeks	Temporary interruption in the trial: if apnea, sepsis and IVH. Minor problems: like oral thrush, pyoderma and hyperbilirubinemia	There were 3 PI who had more than 20% interruption in their procedure and all were in the oil TG. After exclusion observed more WG in TG with oil
<i>Vagal activity, gastric motility and weight gain in massaged preterm neonates</i> ²⁸ Diego MA et al., 2005 Pubmed search 1,4	Total:48 1)TG:16 GAM=29.8w BWM=1091g 2)Gsham:16 GAM=30.3w BWM=1184g 3)CG:16 GAM=29.6w BWM=1265g	Assess whether there alteration in VA, GM and WG in response to MT Beginning when clinically stable	T/KS: 15min 3x/dia for 5 days, 1 hour after feeding Applied by various professionals The Gsham received the same sequence of T/KS with light pressure	1)WG 2)Days of hospitalization 3)VA and GM on day 1 (15min before, during 15 and 15 min after T/KS)	Data collected by a researcher blind. Body weight take with normal nursery routine	Not describe	1)GM greater WG (p <0.01), with no greater caloric intake 3)Increased VA and GM during and shortly after MT

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Databas e	Sample Size	Objetives and beginning	Descriptio n of the technique	Main variables	Measure d weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>The effect of infant massage on weight gain, physiological and behavioral responses in premature infants</i> ¹⁹ Hae-Kyung Lee, 2005 Pubmed search 1,2,3,4,5	Total:26 TG:13 GAM=224.2 days BWM=1508.5 g CG:13 GAM=217.4 days BWM=1377.7 g	Evaluate the response of infants who received MT in WG, physiological and behavioral parameters. Beginning when clinically stable, 2 days after start enteral feeding	T/KS: 15min 2x/day for 10 days, 1h after feeding in the morning and afternoon, with infant's eyes opens. Data collected 10min before and 10min after the T/KS daily. Use of oil to reduce friction. Made by nurses	1)WG 2)Physiological data 3)Behavioral responses 10min evaluated pré and pós MT - videotaped 4)Electrocardiogra m	Nurses on the preceding night shift measured daily WG in the early morning	Study would be discontinue d for at least 1 hour if: HR less than 100bpm or greater than 200bpm for 12s or more, or blood oxygen saturation levels less than 90% for longer than 30s. Infant showed no signs of stress during the study	1)Higher in VA in TG: days1,2,6,7,8 and 9 2)Increased O ₂ Sat on the 9 th day in TG 3) Significant increase alertness, and motor activities 4) There was a significant effect for days(p=0.001) both group increased in WG, on the average, over the 10-day experimental period
<i>Preterm infant massage elicits consistent increases in vagal activity and gastric motility that are associated with greater weight gain</i> ²⁹ Diego MA et al., 2007 Pubmed search 1,4	Total:70 TG:34 CG:36	Determine whether the MT in PI is related to the increase in VA and GM and if it interferes with WG Beginning when clinically stable and gavage-fed	T/KS: 15min 3x/day for 5 days, 1 hour after feeding, early of 3hs consecutive Made by professional	1)Daily WG 2)Caloric intake 3)ECGs and EGGs colected on day 1 and day 5, 15 min before, the 15 min and 15 min after the procedure MT was made at 12am	Body weight take with normal nursery routine	Not describe	1)TG: Increased WG (30% more) 3)TG: Increased VA and GM during MT period, on days 1 and 5 (p <0.001)
<i>Insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) increased in preterm neonates</i> ³⁰ Field et al., 2008 Pubmed search 1,4	Total: 42 TG: GAM=29.3w BWM=1178.5 g CG: GAM=2.8w BWM=1292.5 g	Determine if the MT increased serum insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in PI. Beginning when clinically stable	T/KS: 15min 3x/dia for 5 days, 1 hour after the morning feeding (12am), early of 3hs consecutive Made by therapist	1)Daily WG 2)Daily caloric intake 3)Vital signs before, during and after the MT 4)Serum insuline and IGF-1 on days 1 e 5 5) VA measured at intervals	Body weight take with normal nursery routine (weighed daily prior to the 8am feeding)	Not describe	1)TG: greater WG (p=0.02) 4)TG: increase in insulin (p=0,001) and greater increase in IGF-1 (p=0.05) 5)TG: greater VA (p<0.001)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Databas e	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Descriptio n of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Massage therapy reduces hospital stay and occurrence of late-onset sepsis in very preterm neonates</i> ¹⁶ EW Mendes and RS Procianoy, 2008 Pubmed search 1	Total: 104 TG: 52 GAM=29.7w BWM=1186.8g CG:52 GAM=29.4w BWM=1156.7g	Studying the effects of massage on maternal hospital stay in very low birth weight (VLBW) who were already submitted to skin-to-skin care. Beginning after 48hours of life	MT applied only by mothers, 4x/day for 15min each time intervals 6h. TS: temporal, frontal, periorbital, nasal and perilabial regions of the face and the external side of the upper and lower limbs + KS (3x each: wrist, elbow, ankle and knee)	1)Length of hospital stay 2)Growth 3)Age of partial or total enteral feeding started 4)Age which partial and total oral feeding started 5)Occurrence of late onset sepsis – clinical and blood and or/cerebrospinal fluid 6)Presence of necrotizing enterocolitis and 7)Broncopulmonar y dysplasia	Body weight take with normal nursery routine always verified by a person blinded, in the afternoon and using the same equipments digital baby scale	Not describe	1)TG fewer days (p=0.084) 2)TG: less rate of late-onset sepsis (p<0.01)
<i>Weight gain in preterm infants following parent-administered vimala massage: a randomized controlled trial</i> ¹⁷ Gonzalez AP et al., 2009 Pedro and Pubmed search 1,4	Total: 60 TG:30 GAM=31.4w BWM=1235g CG:30 GAM=31.7w BWM=1220g	Evaluate the WG in PI receiving MT, correlate with lenght of hospital stay and check if there is some other effect Beginning when clinically stable, with orogastric tube feeding	Vimala massage 2x/day for 10 days, 1h after feeding. Made by the mother or father, trained and supervised: face, upper limbs, chest, abdomen, lower limbs and back, without ever losing touch, even though there was some discomfort PI. Used oil or cream	1)Daily WG 2)Daily caloric intake 3)Length of hospital	Body weight take with normal nursery routine, with a digital scale Seca GMBH & Co. kg model 3741321009 (Hamburg, Germany). At 8am every day, 1h before the next scheduled feeding. The person was blind	Not describe	1) TG: greater WG over 10 days and daily WG (p<0.001) 3)TG: shorter hospital stay (p=0.03)
<i>Massage with kinesthetic stimulation improves weight gain in preterm infant</i> ³¹ Massaro AN et al., 2009 Pedro and Pubmed search 1,4	Total:60 TS G: 20 GAM=29w BWM=1097g T/KSG: 20 GAM=29w BWM=1124g CG:20 GAM=27w BWM=959g	To evaluate the effect of MT with and without kinestheti c phase in WG and in the lenght of hospital PI. Beginning when clinically stable	TS (only phase 1 and 3) or T/KS 2x/day for 15min, done by trained nurses, from the beginning of the study until discharge	1)Daily WG 2)Daily caloric intake 3)Length of hospital	Body weight take with normal nursery routine	Not describe	T/KS G: with birth weight > 1000g = higher daily WG (stratificatio n by BW)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measure d weight gain	Descriptio n of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Massage with kinesthetic stimulation improves weight gain in preterm infant</i> ³¹ Massaro AN et al., 2009 Pedro and Pubmed search 1,4	Total:60 TS G: 20 GAM=29w BWM=1097g T/KSG: 20 GAM=29w BWM=1124g CG:20 GAM=27w BWM=959g	To evaluate the effect of MT with and without kinesthetic phase in WG and in the lenght of hospital PI. Beginning when clinically stable	TS (only phase 1 and 3) or T/KS 2x/day for 15min, done by trained nurses, from the beginning of the study until discharge	1)Daily WG 2)Daily caloric intake 3)Lenght of hospital	Body weight take with normal nursery routine	Not describe	T/KS G: with birth weight > 1000g = higher daily WG (stratification by BW)
<i>Massage therapy improves neurodevelopment outcome at two years corrected age for very low birth weight infants</i> ³⁶ Procianoy RS et al., 2010 Pubmed search 1,4	Total:73 TG: 35 GAM=30w BWM=1192g CG:38 GAM=29,7w BWM=1151g both groups Skin-skin care	Assess the outcome of MT growth and neurodevelopment of PI assessed at 2 years corrected age. Beginning after 48hs of life	MT applied only by mothers, 4x/day for 15min, intervals of 6TS: temporal, frontal, periorbital, nasal and perilabial regions of the face and the external side of the upper and lower limbs + KS (3x each: wrist, elbow, ankle and knee)	1)Anthropometric 2)Bayley scales of infant development second edition (BSID-II). Measured at 2 yaers correted age	Body weight take with normal nursery routine	Mothers of the TG were instructed to observe the newborns' tolerance signs, avoid excessive stimulations	2)TG: greater mental development index (p=0.035)
<i>Sensorimotor Interventions Improve Growth and Motor Function in Preterm Infants</i> ¹⁸ Fucile e Gisell, 2010 Pubmed search 1,2,3,4,5,6	Total:75 OS G: 19 T/KS G: 18 OS+T/KS G: 18 CG: 20	To evaluate the effect of OS and T/KS alone on WG and motor function in PI and if OS + T/KS have greater influence on these parameters. Beginning when clinically stable receiving all feedings by tube	OS: 15min 2x/day for 10 days (7 min: cheek, chin, lips, 5min in gum and tongue, and 3 min of non nutritive pacifier sucking). T/KS for 15min 2x/day. TS: Prone and supine, stroking the body starting from the head, followed by the neck, shoulders, back, legs, and arms + KS. Made by researcher	1)Daily WG (g/Kg/dia) 2)Motor Function. Teste of infant motor performance-1969, TIMP	Body weight take with normal nursery routine, nursery was blind and used always the same scale	Stop procedure: if fussing, vomiting, growing oxygen demand, frequent episodes of apnea, bradycardia, or desaturation in the 24hs that preceded the intervention or had interventions like sight or hearing tests had been performed 30min before TKS	1)OS G and T/KS G: greater WG (p=0.014) 2)T/KS G e OS+ T/KS G: greater TIMP scores (p<0.003)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Behavioral analysis of preterm neonates included in a tactile and kinesthetic stimulation program during hospitalization</i> ²⁰ Ferreira e Bergamasco, 2010 Pubmed search 2,3	Total:32 TG: 16 GAM=33.4w BWM=1910.3g CG: 16 GAM=33.3w BWM=1872.81g Not randomized	To evaluate the effect of T/KS evolution behavioral and clinical newborn PI during hospitalization. Beginning when clinically stable	8min/week filming until discharge: behavioral evaluation. TS: made 4 to 5x/week for 5 to 15min, focusing alertness. Soft touches slow and continuous, not rigid sequence, with cerebrosppinal flow direction on the trunk, and proximal distal on the limbs, supine or lateral position. KS: flexion and extension of the limbs Made by reseacher	1)Daily WG 2)Lenght of hospital 3)Behavioral evaluation: adapted from the Manual for the naturalistic observation of behavior of neonates terms or the pre-terms	Body weight take with normal nursery routine	Not describe. Cites some internal events inherent nursery that can interfere with behavioral responses, such as: time after the last feeding, sleep, pain, noise, light, temperature	3)TG greater % time with: Regular respiration (p =0.002) State active warning (p= 0.036) Postures mixed (p=0.013) Balanced tone (p<0.001) TG: higher number of mov hand side, suction, grip and support (p=0.013), more coordinated mov and more frequent (p <0.001) CG: more often extensor posture (p=0.001) and hypotonia (p<0.001)
<i>A randomized placebo-controlled trial of massage therapy on the immune system of preterm infants</i> ³² Ang JY,2012 Pubmed search 1,4	Total: 120 TG: 58 GAM=30 w BWM=1389g CG: 62 GAM=30w BWM=1286g Randomized	The aim of this study was to investigate the effects of MT on the immune system of PI. Beginning when clinically stable	T/KS: 15min, 3x/day, at the beginning of 3 consecutive hs, behind 2 wide screens, for a minimum of 5 days and maximum of 4 weeks or until hospital discharge CG: nurse remained behind the 2 wide screens the same amount of time	1)Immunologic evaluation (absolute NK cells, T and B cells, T cell subsets and NK cytotoxicity 2)WG 3)Number of infections 4)Lenght of hospital stay	Not describe	Not describe	1)TG: NK cytotoxicity higher (p=0.05) 2)TG: more daily WG (p=0.01) and higher final weight (p=0.05)

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objetives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>Massage improves growth quality by decreasing body fat deposition in male preterm infants</i> ³⁷ Moyer-Mileur LJ, 2013 Pubmed search 1,4	Total: 44 TG: 22 GAM=31.4w BWM=1574g CG: 22 GAM=31w BWM=1618g Randomized	To assess the effect of MT on WG and body fat deposition in PI Beginning when tolerating enteral feeding volumes >100mL/Kg/day	20 min 2x/day at 7am and 7pm, 6 days/week (except Sunday), were performed behind a privacy screen by a licensed massage therapist. The MT was modeled after the Infant massage USA protocol and modified for PI by eliminating massage of the abdomen	1)WG 2)Length of hospital stay 3)Ponderal index 4)Body circumferences 5)Skinfold thickness 6)Insuline-like growth factor I, leptin, adiponectin levels 7)Daily dietary intake	Body weight on an electronic infant scale (Air shields, vickers, Ohio) was recorded to the nearest gram	All massage therapists were trained to recognize clinical signs of distress	3)TG: male infants had smaller ponderal index 5)TG: male infants had triceps, subscapular and mid-thigh skinfold thickness increases (p<0.05) TG: female had larger subscapular (p<0.05) 6) Circulating adiponectin increased over time in GC male infants (p < 0.01) and was correlated to ponderal index (p < 0.01)
<i>Effect of Oil massage on growth in preterm neonates less than 1800 g: A randomized control Trial</i> ³⁴ Jagdish Kumar, 2012 Pubmed search 1,4	Total: 48 TG: 25 GAM=32,9w BWM=1466,6g CG: 23 GAM=32.6w BWM=1416.6g Randomized	To study the effect of oil massage on growth in preterm babies less than 1800 g. Beginning < 48h of age and were on at least 100 ml/kg/d of feed oral or tube feed	10min, 4x/day, 4w massage was carried out first over both shoulders starting from the neck with the baby in prone position. Then it was carried out from the upper back to the waist. Each of the two upper and lower limbs was separately massaged in the supine position. Twenty gentle strokes in each area. Massage was provided with 2.5 ml/kg (10ml/kg/day) of sunflower oil, by researcher or mother (if discharged before 4w)	1)WG after 28d 2)Length and head circumference after 28d 3)Loss of weight after 7 day 4)Difference in serum triglyceride levels after 28 day	Were measured using standard techniques, at enrolment and then weekly for next 4 w	Not describe	1)TG more WG over 28d p<0.05 3) TG less weight loss after 7d p=0.003

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

Continuation.

Title/Author/ Year/Database	Sample Size	Objectives and beginning	Description of the technique	Main variables	Measured weight gain	Description of adverse events during the procedure	Results achieved statistical significance
<i>The efficacy of massage on short and long term outcomes in preterm infants</i> ³⁵	Total: 66 TG: 32 GAM=32.2w BWM=1747g CG: 34 GAM=32.6w BWM=1684g	To assess the short and long term benefits of MT on stable PI	TS, without KS, for 10 min, for at least 10 d, 1x/day, doing by trained mothers, using 2mL of olive oil (6 drops).	1)PIPP after MT 2)PIPP at discharge 3)Cognitive score (Bayley scales) 4) WG 5)Length of stay 6) Breastfeeding duration 7)Motor score (Bayley scales)	Not describe	The infant's reaction TS was monitored by a research assistant for any adverse physical or behavioral signs, Sat O ₂ , HR and RR. At any sign of physiologic distress (HR greater than 200 bpm or Sat O ₂ less than 95%), massage was discontinued for 15 s, or until a return to baseline levels then resumed. None infants experienced any above signs	1)Lower scores on the PIPP after MT p=0.041 2) Lower PIPP scores on discharge p=0.011 3) Higher cognitive scores of TG at 12 months corrected age p=0.004

w-week; hs- hours; TS – tactile stimulation; T/KS – tactile and kinesthetic stimulation; KS-kinesthetic stimulation; HR-heart rate; RR- respiratory rate; BW-birth weight; KG-kilograms; GA- gestacional age; BW-birth weight; NICU- Neonatal intensive care unit; MT-massage

REFERENCES

1. Smith GC, Gutovich J, Smyser C, Pineda R, Newnham C, Tjoeng T H, et al. Neonatal Intensive Care Unit Stress Associated with Brain Development Preterm Infants. *Ann Neurol*. 2011;70:541-549.
2. Fernandes LV, Goulart AL, Santos AMN, Barros MCM, Guerra CC, Kopelman BI. Neurodevelopmental assessment of very low birth weight preterm infants at corrected age of 18-24 months by Bayley III scales. *J. Pediatr. (Rio J.)* [online]. 2012;88, n.6, pp. 471-478. *J Pediatr (Rio J)*. 2012; 88(6): 471-478.
3. White JL, Labarba RC. The effects of tactile and kinesthetic stimulation on neonatal development in the premature infant. *Dev Psychobiol*. 1976;9:569-77.
4. Freedman, DG, Boverman, H., Freedman, N. Effects of kinesthetic stimulation on weight gain and on smiling in premature infants. Paper presented at the meeting of the American Orthopsychiatric Association, San Francisco; 1966.
5. Hasselmeyer, EG. The premature neonate's response to handling. *American Nursing Association*. 1964; 11:15-24.
6. Solkoff N, Weintraub D, Yaffe S, Blasé B. Effects of handling on the subsequent development of premature infants. *Dev Psychol*. 1969;1:765-9.
7. Kramer M: Extra tactile stimulation of the premature infant. *Nurs Res*. 1975; 24:324-54.
8. Solkoff N, Matuszak D. Tactile stimulation and behavioral development among low birth weight infants. *Child Psychiat Hum Dev*. 1973; 6:33-7.
9. Rausch PB. Effects of tactile and kinesthetic stimulation on premature infants. *J O G N Nursing*. 1981;10:34-7.
10. Field TM, Schanberg SM, Scafidi F, et al. Tactile/kinesthetic stimulation effects on preterm neonates. *Pediatrics*. 1986; 77(5):654-8.
11. Hernandez-Reif M, Diego M, Field T. Preterm infants show reduced stress behaviors and activity after 5 days of massage therapy. *Infant Behav Dev*. 2007; 30(4):557-61.
12. The Physiotherapy Evidence Database (PEDro) at <www.pedro.fhs.usyd.edu.au>, searched on July 17, 2014.
13. The United States National Library of Medicine of the National Institutes of Health (PubMed) at <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, searched on July 17, 2014.
14. Mathai S, Fernandez A, Mondkar J, Kanbur W. Effects of tactile-kinesthetic stimulation in preterms: A controlled trial. *Indian Pediatr*. 2001; 38:1091-8.

15. Ferber SG, Kuint J, Weller A, Feldman R, Dollberg S., et al. Massage therapy by mothers and trained professionals enhances weight gain in preterm infants. *Early Hum Dev.* 2002;67:37-45.
16. Mendes EW, Procianoy RS. Massage therapy reduces hospital stay and occurrence of late-onset sepsis in very preterm neonates. *J Perinatol.* 2008;28(12):815-20.
17. Gonzalez AP, Vasquez-Mendoza G, Garcia-Vela A, Guzman-Ramirez A, Salazar-Torres M, Romero-Gutierrez G. Weight gain in preterm infants following parent-administered Vimala massage. *Am J Perinatol.* 2009;26:247-52.
18. Fucile S, Gisel EG. Sensorimotor interventions improve growth and motor function in preterm infants. *Neonatal Netw.* 2010;29(6):359-66.
19. Lee H. The effect of infant massage on weight gain, physiological and behavioral responses in premature infants. *J Korean Acad Nurs.* 2005;35(8):1451-60.
20. Ferreira, AM, Bergamasco NHP. Análise comportamental de recém-nascidos pré-termos incluídos em um programa de estimulação tátil-cinestésica durante a internação hospitalar. *Rev Bras Fisioter.* 2010;14(2):141-8.
21. Scafidi FA, Field TM, Schanberg SM, Bauer CR, Vega Lahr N, Garcia R, et al. Effects of tactile/kinesthetic stimulation on the clinical course and sleep/wake behavior of preterm neonates. *Infant Behav Dev.* 1986;9:91-105.
22. Field, T., Scafidi, F., Schanberg, S. Massage of preterm newborns to improve growth and development. *Pediatric Nursing.* 1987; 13:385-7.
23. Scafidi FA, Field T, Schanberg SM, et al. Massage stimulates growth in preterm infants: a replication. *Infant Behav Dev.* 1990;13:167-88.
24. Field T, Schanberg S. Massage alters growth and catecholamine production in preterm newborns. In: Field T, Brazelton TB, (eds). *Advances in Touch.* Skillman, NJ: Johnson & Johnson. 1990. p. 96-104.
25. Wheeden A, Scafidi FA, Field T, Ironson G, Valdeon C, Bandstra E. Massage effects on cocaine-exposed preterm neonates. *J Dev Behav Pediatr.* 1993;14:318-22.
26. Scafidi FA, Field T, Schanberg SM. Factors that predict which preterm infants benefit most from massage therapy. *J Dev Behav Pediatr.* 1993;14:146-80.
27. Dieter JNI, Field T, Hernandez-Reif M, Emory EK, Redzepi M. Stable preterm infants gain more weight and sleep less after five days of massage therapy. *J Pediatr Psychol.* 2003;28:403-11.

28. Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M. Vagal activity, gastric motility, and weight gain in massaged preterm neonates. *J Pediatr*. 2005;147(1):50-5.
29. Diego MA, Field R, Hernandez-Reif M, Deeds O, Ascencio A, Bergert C. Preterm infant massage elicits consistent increases in vagal activity and gastric motility that are associated with greater weight gain. *Acta Paediatr*. 2007;96:1588-91.
30. Field T, Diego M, Hernandez-Reif M, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 increased in preterm neonates. *J Dev Behav Pediatr*. 2008; 29:463-6.
31. Massaro AN, Hammad TA, Jazzo B, Aly H. Massage with kinesthetic movement improves weight gain in preterm infants. *J Perinatol*. 2009;29:352-7.
32. Ang JY, Lua JL, et al. A randomized placebo-controlled trial of massage therapy on the immune system of preterm infants. *Pediatrics*. 2012;130(6):1549-58.
33. Arora J, Kumar A, Ramji S. Effect of oil massage on growth and neurobehavior in very low birth weight preterm neonates. *Indian Pediatr*. 2005;42:1092-100.
34. Kumar J, Upadhyay A, Dwivedi A K, Gothwal S, Jaiswal V, Aggarwal S. Effect of oil massage on growth in preterm neonates less than 1800 g: A randomized control trial. *Indian J Pediatr*. 2012; 80(6):465-469.
35. Abdallah B, Badr L K, Hawwari M. The efficacy of massage on short and long term outcomes in preterm infants. *Infant Behav Dev*. 2013;36(4):662-9.
36. Procianoy, R.S. and Mendes, E.W. and Silveira, R.C. Massage therapy improves neurodevelopment outcome at two years corrected age for very low birth weight infants. *Early Hum Dev*. 2010; 86:7-11.
37. Moyer-Mileur LJ, Haley S, Slater H, Beachy J, Smith SL. Massage improves growth quality by decreasing body fat deposition in male preterm infants. *J Pediatr*. 2013;162(3):490-5.
38. Livingston K, Beider S, Kant AJ, Gallardo CC, Joseph MH, Gold JJ. Touch and massage for medically fragile infants. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009;6(4):473-82.
39. Benavides-Gonzalez H, Rivera-Rueda MA, Ibarra-Reyes MP, Flores-Tamez ME, et al. Effects of early multimodal stimulation on preterm newborn infants. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1989;46(12):789-95.
40. Vaivre-Douret L, Oriot D, Blossier P, Py A, Kasolter-Peret M, Zwang J. The effect of multimodal stimulation and cutaneous application of vegetable oils on neonatal development in preterm infants: a randomized controlled trial. *Child Care Health Dev*. 2008;35:96-107.
41. Sankaranarayanan K, Mondkar JA, Chauhan MM, Mascarenhas BM, Mainkar AR, Salvi RY. Oil massage in neonates: an open randomized controlled study of coconut versus mineral oil. *Indian Pediatr*. 2005;42:877-84.

42. Field T, Diego MA, Hernandez-Reif M, Deeds O, Figuereido B. Moderate versus light pressure massage therapy leads to greater weight gain in preterm infants. *Infant Behav Dev.* 2006;29(4):574-8.
43. Lahat S, Mimouni FB, Ashbel G, Dollberg S. Energy expenditure in growing preterm infants receiving massage therapy. *J Am Coll Nutr.* 2007;26:356-9.
44. Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M. Temperature increases in preterm infants during massage therapy. *Infant Behav Dev.* 2008;31(1): 149-152.
45. Aly H, Moustafa MF, Hassanein SM, Massaro AN, Amer HA, Patel K. Physical activity combined with massage improve bone mineralization in premature infants: a randomized trial. *J Perinatol.* 2004;24:305-309.
46. Moyer-Mileur LJ, Brunstetter V, McNaught TP, Gill G, Chan GM. Daily physical activity program increases bone mineralization and growth in preterm very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2000; 106(5):1088-92.
47. Vignochi CM, Miura E, Canani LH. Effects of motor physical therapy on bone mineralization in premature infants: a randomized controlled study. *J Perinatol.* 2008; 28:624-631.
48. Vignochi CM, Silveira RC, Miura E, Canani LH, Procianoy RS. Physical therapy reduces bone resorption and increases bone formation in preterm infants. *Am J Perinatol.* 2012;29:573-578.
49. Litmanovitz I, Dolfen T, Arnon S, Regev RH, Nemet D, Eliakim A. Assisted exercise and bone strength in preterm infants. *Calcified Tissue Int.* 2007;80:39-43.
50. Schulzke SM, Trachsel D, Patole SK. Physical activity programs for promoting bone mineralization and growth in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(2):CD005387.

Artigo 2

"Methodology used for collecting saliva of preterm newborns to measure cortisol: systematic review"

ABSTRACT

Objective: systematically analyze the methods used by clinical trials published in the last 10 years to collect preterm newborn's saliva to measure cortisol. **Method:** Three databases PubMed, Scopus, and Embase were searched in December 2016. Two researchers independently selected studies by title, and the abstracts of the selected studies were read to determine which ones met the inclusion criteria. All clinical trials of hospitalized preterm newborns that collected saliva to measure salivary cortisol were included. **Results:** Two types of methods were used for collecting saliva: aspiration or absorption, using absorbent materials. All nine aspiration-based studies and the 24 absorption-based studies managed to measure salivary cortisol in at least some samples. Twenty-one studies reported losing some samples. The most common reasons for sample losses were insufficient saliva. Meta-regression (meta-analysis) and random effects model investigated possible relationships between percentage of sample losses and the following variables at a significance level of 5%: collection method, collection material, collection time, and type of assay. Aspiration resulted in fewer sample losses than absorption ($p < 0.0001$). However, only 33.3% (3 of 9) of aspiration-based studies reported the number of sample losses against 81.8% (18 of 22) of absorption-based studies. The most used assays to measure salivary cortisol were ELISA and radioimmunoassay. **Conclusion:** Salivary cortisol measurement in preterm newborns may be useful for assessing and comparing the level of stress generated or relieved by different stimuli. Saliva collection methods have not been standardized, preventing the reproduction of studies that use these methods.

Key Words: salivary cortisol; preterm newborn; review.

"Metodologia utilizada na coleta de saliva em recém-nascidos pré-termo para dosagem de cortisol: revisão sistemática"

RESUMO

Objetivo: identificar os métodos utilizados para coleta de saliva em recém-nascidos pré-termo para dosagem de cortisol. **Método:** pesquisa feita em 3 bases de dados, PubMed, Scopus e Embase, em dezembro de 2016. Dois pesquisadores avaliaram, independentemente, títulos, resumos e selecionaram estudos para leitura na íntegra. Foram incluídos ensaios clínicos publicados entre 2006 e 2016 que realizaram coleta de saliva para dosagem de cortisol em recém nascidos pré-termo, durante o período de internação. **Resultados:** 33 artigos preencheram os critérios de inclusão. A coleta de saliva variou em método (aspiração ou material absorvente), tempo de coleta e técnica de dosagem. A maioria dos estudos realizou a coleta utilizando material absorvente. Sem levar em consideração o ensaio escolhido, os trabalhos que optaram por aspiração obtiveram menor taxa de perda de amostras em comparação aos estudos que optaram por material de absorção: 15.19% (média) e 11.66% (mediana) contra 23.91% (média) e 15.92% (mediana). No entanto, apenas 33.3% (3 de 9) dos estudos que utilizaram aspiração relataram o número de amostras perdidas contra 81.8% (18 de 22) dos que utilizaram material absorvente. Os ensaios mais utilizados foram ELISA e Radioimunoensaio. **Conclusão:** Evidenciou-se que há falta de padronização nos métodos de coleta, o que isso dificulta a realização e compromete a reprodutibilidade dos estudos que visam utilizar esse método.

Palavras chave: prematuro, cortisol salivar, revisão.

INTRODUCTION

Although the inherent care provided by a neonatal intensive care unit (NICU) stresses preterm newborns (PTNs), it is critical for their survival¹. Studies have searched for alternative and complementary therapies, such as music therapy², tactile-kinesthetic stimulation³, kangaroo care⁴, and skin-to-skin contact⁵, to the standard treatment to reduce factors that cause tension in an NICU. Salivary cortisol level, which can be detected already in the first week of life⁷, increases in individuals experiencing adverse situations, and PTNs have higher salivary cortisol level than term newborns⁶. In order to assess the efficacy of alternative and complementary therapies, noninvasive tests, such as PTN salivary cortisol measurement, have been performed^{8,9,10,11,12}. Noninvasive methods that measure cortisol to possibly determine newborns' level of discomfort may be used to assess routine and new NICU procedures.

Despite the possible benefits of this type of assessment in newborns, studies discuss whether salivary cortisol is indeed associated with newborns' stress and plasma cortisol levels^{13,14}. Studies that performed salivary cortisol measurements used different methodologies. The objective of this review was to systematically analyze the methods used by clinical trials published in the last 10 years to collect PTNs' saliva to measure cortisol, to determine the most successful methods for collecting saliva, and to list the advantages and disadvantages of each method.

METHOD

Three databases, PubMed (United States National Library of Medicine of the National Institutes of Health), Scopus, and Embase (Excerpta Medica Database) were searched in December 2016 using the keywords "salivary cortisol" AND "premature." This was the combination of keywords that returned the highest number of studies in each database.

A database was created using the software EndNote, which manages references, and the data were judiciously stored in folders. Two researchers independently selected studies by title, and the abstracts of the selected studies were read to determine which ones met the inclusion criteria. If the researchers disagreed, the study was saved to be read in full.

SELECTION CRITERIA

All studies found in the abovementioned databases that collected saliva from PTNs were selected.

INCLUSION CRITERIA

All clinical trials of hospitalized PTNs that collected saliva to measure salivary cortisol published in the last 10 years in Portuguese, English, or Spanish were included.

EXCLUSION CRITERIA

Studies that collected saliva after the newborn left the hospital, posters, studies that measured cortisol in term newborns, and studies in languages other than those mentioned above were excluded.

RESULTS

The keywords “salivary cortisol” AND “premature” returned 235 studies, 86 from PubMed, 69 from Embase, and 80 from Scopus. Repeated studies were eliminated, resulting in 152 studies for title assessment. Two researchers performed all inclusion and exclusion procedures independently.

Forty-five articles were excluded based on their titles, and later, another 35 studies were excluded based on their abstracts. Twenty-one studies of the remaining 72 were excluded because they had been published before December 2006. Thus, 51 studies were read in full, of which 32 complied with the inclusion and exclusion criteria. Nineteen studies were eliminated during this phase for the following reasons: five did not collect saliva during hospital stay¹⁵⁻¹⁹, four did not collect saliva from PTNs²⁰⁻²³, two did not measure salivary cortisol, only plasma cortisol^{24,25}, three were presented as posters²⁶⁻²⁸, two only collected maternal saliva (n=2)^{29,30}, one was published in Persian³¹, and the whole text of two was not found^{32,33} (Figure 1). One more study listed in the references of one of the reviewed studies was included¹³. In summary,

235 articles were found in the three researched databases, and after elimination of the duplicates and application of the inclusion and exclusion criteria, 33 studies remained (Table 1).

TABLE 1. Description of study objectives

<i>Autor/Ano</i>	<i>Título</i>	<i>Objetivos</i>
<i>Soliman et al 2016</i>	<i>Does Topical Lidocaine Reduce the Pain Associated With the Insertion of Nasal Continuous Positive Airway Pressure Prongs in Preterm Infants? A Randomized, Controlled Pilot Trial</i>	To evaluate the efficacy of topical lidocaine 2% gel in reducing the pain associated with the insertion of nasal continuous positive airway pressure (nCPAP) prongs in preterm infants
<i>Castral et al 2015</i>	<i>Maternal mood and concordant maternal and infant salivary cortisol during heel lance while in kangaroo care</i>	<i>To examine the concordance of salivary cortisol reactivity between 42 mothers and their stable preterm infants during routine infant heel lance while in KC and to compare salivary cortisol between groups of mothers with and without PPDA and their infants</i>
<i>Moore et al 2015</i>	<i>Comparison of cortisol samples in the first two weeks of life in preterm infants</i>	<i>To examine cortisol samples for usability, associations, and individual stability in neonates</i>
<i>Osman et al 2015</i>	<i>Assessment of pain during application of nasal-continuous positive airway pressure and heated, humidified high-flow nasal cannulae in preterm infants</i>	<i>To assess pain and its severity in preterm infants during application of nCPAP and HHHFNC</i>
<i>Schwilling et al 2015</i>	<i>Live music reduces stress levels in very low-birthweight infants</i>	<i>To evaluate the effect of live harp music on the stress level indicators of preterm infants in a neonatal intensive care unit</i>
<i>Badiee et al 2014</i>	<i>Cobedding of twin premature infants: calming effects on pain responses</i>	<i>To evaluate the effect of live harp music on the stress level indicators of preterm infants in a neonatal intensive care unit</i>
<i>Campbell-Yeo et al 2014</i>	<i>Co-bedding Between Preterm Twins Attenuates Stress Response After Heel Lance Results of a Randomized Trial</i>	<i>To determine whether cobedding of preterm twins has analgesic effects during heel lancing or not</i>

Continuation.

<i>Autor/Ano</i>	<i>Título</i>	<i>Objetivos</i>
<i>Candia et al 2014</i>	<i>Influence of prone positioning on premature newborn infant stress assessed by means of salivary cortisol measurement: pilot study</i>	<i>To examine the effect of co-bedding between preterm twins on stress response after heel lance</i>
<i>Dorn et al 2014</i>	<i>Influence of acoustic stimulation on the circadian and ultradian rhythm of premature infants</i>	<i>To assess the influence of prone positioning on the stress of newborn premature infants through the measurement of the salivary cortisol concentration and the evaluation of physiological and behavioral responses before and after changes in body positioning</i>
<i>Klingenberg et al 2014</i>	<i>Patient comfort during treatment with heated humidified high flow nasal cannulae versus nasal continuous positive airway pressure: a randomised cross-over trial</i>	<i>To evaluate the development of the circadian rhythm of the salivary cortisol in premature infants and its correlation with the onset of the sleep-activity behavior pattern during the first 3 weeks of life under controlled light:dark conditions. Furthermore, we investigated the influence of acoustic stimulation by audiotaped lullabies or the maternal voice on the cortisol values and long-term sleep-activity patterns</i>
<i>Neu et al. 2014</i>	<i>Effect of holding on co-regulation in preterm infants: A randomized controlled trial</i>	<i>To determine whether kangaroo holding of healthy preterm infants over the first eight weeks of an infant's life facilitates co-regulation of salivary cortisol between mother and infant</i>
<i>Maas et al 2014</i>	<i>Relationship of Salivary and Plasma Cortisol Levels in Preterm Infants: Results of a Prospective Observational Study and Systematic Review of the Literature</i>	<i>To investigate the relationship of salivary and plasma cortisol levels in preterm infants with special regard to usability of salivary cortisol in diagnostic work- up of infants at risk of adrenal insufficiency</i>
<i>Badiee et al 2013</i>	<i>The Calming Effect of Maternal Breast Milk Odor on Premature Infants</i>	<i>To compare the effectiveness of maternal breast milk odor and formula milk odor in soothing premature infants undergoing heel lancing</i>
<i>Cabral et al. 2013</i>	<i>Measurement of Salivary Cortisol as a Marker of Stress in Newborns in a Neonatal Intensive Care Unit</i>	<i>To evaluate the newborn stress response during the inpatient time in the NICU</i>
<i>Mitchell et al 2013</i>	<i>Does Daily Kangaroo Care Provide Sustained Pain and Stress Relief in Preterm Infants?</i>	<i>To Determine whether stress in preterm infants, measured with salivary cortisol, decreases after five days of KC compared to five days of SC</i>

Continuation.

<i>Autor/Ano</i>	<i>Título</i>	<i>Objetivos</i>
<i>Moore et al 2013</i>	<i>Relations Between Feeding Intolerance and Stress Biomarkers in Preterm Infants</i>	<i>To examined Feed Intolerance as a stress-related disease involving brain–gut interactions and tested the model of allostatic load and complications of prematurity</i>
<i>Ng et al 2013</i>	<i>A novel method of collection of saliva for estimation of steroid levels in extremely premature infants</i>	<i>To describe a simple, non-stressful way to obtain saliva samples for cortisol dosing in premature infants</i>
<i>Ribeiro et al 2013</i>	<i>Human Milk for neonatal pain relief during ophthalmoscopy</i>	<i>To establish the effectiveness of human milk, compared with sucrose for pain relief in premature infants subjected to ophthalmoscopy for early diagnosis</i>
<i>Mitchell et al 2012</i>	<i>Challenges, Guidelines, and Systematic Review of Salivary Cortisol Research in Preterm Infants</i>	<i>To determine the feasibility of collecting saliva from neonates in moderate respiratory distress who were between 27 and 30 weeks gestational age</i>
<i>Castral et al 2012</i>	<i>Maternal factors regulating preterm infants' responses to pain and stress while in maternal kangaroo care</i>	<i>To investigate the association between maternal factors (behavior, depression and/or anxiety, and stress) and the response of newborns to pain and stress when undergoing heel puncture for the neonatal screening test while held in the kC</i>
<i>Ivars et al 2012</i>	<i>Nasopharyngeal suctioning does not produce a salivary cortisol reaction in preterm infants</i>	<i>To investigate whether NPS is stressful in CPAP-treated preterm infants and in full-term infants. The primary outcome was salivary cortisol reactivity</i>
<i>Mörelus et al 2012</i>	<i>The Stockholm Neonatal Family-Centered Care Study: Effects on salivary cortisol in infants and their mothers</i>	<i>To evaluate the effect of family-centered care on salivary cortisol reactivity in mothers and preterm infants and the correlation between them</i>
<i>Chou et al 2011</i>	<i>The relationship of salivary and cord blood cortisol in preterm infants</i>	<i>To explore the use of salivary cortisol as an accurate measure of adrenal steroid production in premature infants, correlation between salivary and serum cortisol in premature infants looms as a possible alternative</i>
<i>Cong et al 2011</i>	<i>Randomized Crossover Trial of Kangaroo Care to Reduce Biobehavioral Pain Responses in Preterm Infants: A Pilot Study</i>	<i>To determine whether KC reduced heel stick pain as measured by the PIPP and salivary and serum cortisol levels better than the standard incubator care in two studies when KC was administered for 80 or 30 min before the heel stick</i>
<i>Bauer et al 2009</i>	<i>Effects of Budesonide Inhalation on Energy Expenditure, Somatic Growth and Salivary Cortisol Levels in Preterm Infants with Chronic Lung Disease</i>	<i>To investigate the impact of inhaled glucocorticoids on EE, somatic growth and adrenal function in preterm infants with CLD</i>

Continuation.

<i>Autor/Ano</i>	<i>Título</i>	<i>Objetivos</i>
<i>Cignacco et al 2009</i>	<i>Variability in pain response to a non-pharmacological intervention across repeated routine pain exposure in preterm infants: a feasibility study</i>	<i>The purpose of the present study was to investigate the impact of inhaled glucocorticoids on EE, somatic growth and adrenal function in preterm infants with CLD</i>
<i>Neu et al 2009</i>	<i>Coregulation in Salivary Cortisol During Maternal Holding of Premature Infants</i>	<i>To examine coregulation between mothers and preterm infants in HPA activity, as indicated by salivary cortisol levels, while mothers held their infants</i>
<i>Schaffer et al 2009</i>	<i>Antenatal Betamethasone Administration Alters Stress Physiology in Healthy Neonates</i>	<i>To analyze hypothalamic-pituitary-adrenal axis balance in healthy newborns after antenatal beta-methasone treatment for lung maturation where delivery could be prolonged until or near term</i>
<i>Gibbins et al 2008</i>	<i>Pain behaviours in Extremely Low Gestational Age infants</i>	<i>To examine the physiological, behavioural and biochemical responses to painful and non-painful procedures in ELGA infants and the influence of gestational age and sex</i>
<i>Kleberg et al 2008</i>	<i>Lower Stress Responses After Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program Care During Eye Screening Examinations for Retinopathy of Prematurity: A Randomized Study</i>	<i>To investigate whether a NICAP during a retinopathy of prematurity examination results in less adverse behavioral, pain, and stress responses as compared with standard care</i>
<i>Davis et al 2006</i>	<i>Antenatal betamethasone treatment has a persisting influence on infant HPA axis regulation</i>	<i>To examine the consequences of antenatal betamethasone exposure on postnatal stress regulation</i>
<i>Morélius et al 2006</i>	<i>Is a nappy change stressful to neonates?</i>	<i>To investigate whether NICU infants have different pattern of stress and pain responses than healthy newborns when challenged by a non-painful everyday care routine</i>
<i>Ashwood et al 2006</i>	<i>Neonatal adrenal function after repeat dose prenatal corticosteroids: A randomized controlled trial</i>	<i>Do repeat prenatal corticosteroids suppress neonatal cortisol concentrations?</i>

CPAP: nasal-continuous positive airway pressure; HL: heel lancer; PPDA: post-partum depression and/or anxiety; HHHFNC: humidified high-flow nasal cannulae; NICU: neonatal unit care; NPS: Nasopharyngeal suctioning KC: kangaroo care; HPA: hypothalamic-pituitary-adrenocortical; ELGA: extremely low gestational age; NIDCAP: newborn individualized developmental care and assessment program; CLD: Chronic Lung Disease.

Two types of methods were used for collecting PTNs' saliva: aspiration or absorption, using absorbent materials. Aspiration was performed with a pipette^{8,11}, syringe connected to a plastic tube, needleless push button blood collection set or probe^{9,34-39}, or tracheal suction set⁴⁰. The absorbent materials used for absorbing the newborns' saliva were swabs or cotton buds of different brands and models^{6,10,12,14,37,41-54}, filter paper^{13,55,56}, or sterile dental cotton roll tied with a dental floss⁵⁷. One of the studies used both collection methods, swab and aspiration³⁷, and one did not specify how PTN saliva was collected⁵⁸.

Only one of the studies that specified saliva extraction method did not use centrifugation. That study collected saliva with a sterile dental cotton roll and extracted the saliva by placing the roll inside a 5ml syringe and pressing the plunger to expel the saliva⁵⁷.

Collection time varied between studies. Aspiration-based studies did not inform the duration of the procedure, and only two studies reported the amount of collected saliva^{35,39}. Aspiration pressure was not informed by any study, and only one study reported using "enough negative pressure to suck 0.5 to 1.0 ml of newborn saliva"³⁸. Nine absorption-based studies did not inform for how long the absorbent material stayed in the newborns' mouths^{2,6,10,14,37,41,47,48,53}. Four studies that provided such information left the material in the newborns' mouths for five minutes^{45,50,52,54}; one, for 10 minutes⁴³; one, for at least 20 minutes⁵¹; one, for five to ten minutes⁴²; one, for 20 to 25 minutes⁴⁴; one, for one to two minutes⁴⁶; one, for 30 to 60 seconds⁴⁹; and one left the first 10 samples in the PTNs' mouths for three minutes, and the subsequent 53 samples, for 20 minutes¹³.

All nine aspiration-based studies and the 24 absorption-based studies managed to measure salivary cortisol in at least some samples. Two studies omitted the results because their samples did not have enough saliva.^{37,43}

Twenty-one studies reported losing some samples^{6,8,10-14,35,37,41-46,48,51,53,55-57}. The most common reasons for sample losses were insufficient saliva^{6,10-14,37,41-44,46,48,51,53,55-57} and/or contamination with blood^{8,11,45}. Only one study lost samples due to the viscosity of the absorbent material³⁵. The percentage of sample losses due to insufficient saliva ranged from 0% to 90%. Of the studies that specified collection method and reported the total number of sample losses, three used aspiration and 18 used absorbent materials. Six aspiration-based studies and four absorption-based studies did not inform whether any samples were lost or the number of sample losses (Table 2).

TABLE 2. Description of collection method, material, assay and % of sample lost

Author/Year	Collection method	Material used	Collection time	Assay	% of samples lost	Total number of samples
Soliman 2016	Aspiration	500 ul pipette	-	ELISA	11.66%	60
Castral 2015	Aspiration	Plastic tube connected to needleless syringe	-	RIE	-	-
Moore 2015	Absorbent material	Pediatric swab	5 min	RIE	14.13%	93
Osman 2015	Aspiration	500 ul pipette	-	ELISA	10.12%	79
Schiwilling 2015	Absorbent material	Swab split in 4	-	2D-LC-MS/MS	8.88%	180
Badiee 2014	Aspiration	2 ml syringe	-	ELISA	-	200
Campbell 2014	Absorbent material	Swab	-	ELISA	26.67%	129
Candia 2014	Aspiration	10 ml syringe connected to a needleless flexible intravenous catheter (18)	-	ECL	23.80%	42
Dorn 2014	Absorbent material	Swab	5 to 10 min	ELISA	35%	422
Klingenberg 2014	Absorbent material	Swab	10 min	RIE	86.25%	80
Neu 2014	Absorbent material	Filter paper	30 s to 2 min	ELISA	3.8%	711
Maas 2014	Absorbent material	Eye sponge	-	ELISA	48.27%	58
Badiee 2013	Aspiration	2 ml syringe	-	ELISA	-	100
Cabral 2013	Aspiration	Aspiration probe no. 4 Levine and a 5 ml syringe	-	RIE	-	40
Mitchell 2013	Absorbent material	Eye sponge	3 min first 10 samples and 20 min the next 53 samples	ELISA	36.84%	76
Moore 2013	Absorbent material	Pediatric swab	5 min	ELISA	13.98%	93
Ng 2013	Absorbent material	Swab	1 to 2 min	ELISA	15%	195
Ribeiro 2013	Aspiration	Needleless push button blood	-	RIE	-	-

		collection set no. 21 connected to a 3 ml syringe				
Mitchell 2012	Absorbent material	Filter paper	10 samples for 3 min 53 samples for 20 min	ELISA	3 min=70% 20 min=17%	3 min=10 20 min=53
Castral 2012	Does not specify	-	-	-	-	-
Ivars 2012	Absorbent material	Cotton buds	-	RIE	0%	44
Mourelus 2012	Absorbent material	Cotton buds	-	RIE	15.916%	578
Chou 2011	Absorbent material	Cotton swab split in 2	30 to 60 s	RIE	-	-
Cong 2011	Absorbent material	Swab	4 to 5 min	RIE	-	-
Bauer 2009	Aspiration	Tracheal suction set	-	-	-	-
Cignacco 2009	Absorbent material	Oral Swab	20 min	RIE	1.11%	90
Neu 2009	Absorbent material	Filter paper folded in half	30 s to 3 min	ELISA	5%	40
Schaffer 2009	Absorbent material	Swab	5 min	EMCL	-	-
Gibbins 2008	Absorbent material + Aspiration	Swab Qtip and aspiration with syringe	-	RIE	90%	40
Kleberg 2008	Absorbent material	Cotton bud	-	RIE	25%	310
Davis 2006	Absorbent material	Swab Qtip	5 min	DELFI	-	-
Mourelus 2006	Absorbent material	Cotton buds	-	RIE	Diaper change 1:15.4% Diaper change 2:18%	78
Ashwood 2006	Absorbent material	Dental cotton roll tied by dental floss	10 to 20 min	ELISA	15%	320

This group of studies (three that used aspiration and 18 that used absorbent materials) made 181 and 3560 attempts to collect saliva using aspiration and absorbent materials, respectively. Aspiration-based studies lost fewer samples than absorption-based studies, regardless of assay method. The measures of central tendency of the percentage of aspiration-

based sample losses were 15.19% (mean) and 11.66% (median), and of absorption-based sample losses were 23.91% (mean) and 15.92% (median). However, only 33.3% (3 of 9) of aspiration-based studies reported the number of sample losses against 81.8% (18 of 22) of absorption-based studies.

Meta-regression (meta-analysis) and random effects model investigated possible relationships between percentage of sample losses and the following variables at a significance level of 5%: collection method, collection material, collection time, and type of assay (Table 3). Aspiration resulted in fewer sample losses than absorption ($p < 0.0001$)

TABLE 3. Evaluation of % loss according to the studied factors (type , material, essay and collection time) - META REGRESSION

Variables	P-value	effect size
Collection Method	<.0001	0.1742
Collection Material	0.2213	0.2385
Type of Assay	0.0122	0.2163
Collection Time	0.0632	0.1230

The studies used the following assays to measure salivary cortisol: radioimmunoassay^{6,9,10,37-39,43,47-51,53}, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{8,11,13,14,34,36,41,42,44-46,55-57}, liquid chromatography-mass spectrometry^{12,52}, electrochemiluminescence³⁵, and fluorescent immunoassay⁵⁴.

Inspection of the oral mucosa before saliva collection was one of the measures taken by the studies to avoid sample contamination with blood⁴⁶. Three studies collected saliva 30 to 60 minutes after feeding to avoid sample contamination with milk^{6,8,9,11,12,35,39,40,42,46-48,57}. Two studies cleaned the oral cavity before saliva collection^{35,57}, and one study cleaned the oral cavity and collected a second saliva sample if the first sample appeared contaminated with blood⁴⁵. Only one study did not exclude samples contaminated with blood or milk².

DISCUSSION

The present review, which included studies published in the last ten years, aimed to help future studies by describing saliva collection methods, collection time, collection materials, and the success rates of each method. The objective of most reviewed studies was to compare the level of stress in PTNs undergoing different therapies (Table 1). Salivary cortisol measurement may be a useful tool for assessing the cost-benefit ratio of some relaxation methods and the effects of stress caused by the NICU routine (heel lance, diaper change).^{6,9,34,41}

The main objective of Ng et al.⁴⁶ was to describe a new methodology to collect PTNs' saliva to measure cortisol. Although saliva collection is generally regarded as noninvasive, the local research ethics committee that approved said study considered suction invasive as it could injure PTN mucous membranes, which are extremely fragile, and contaminate the sample with blood. Another possible disadvantage of aspiration is having to control suction pressure. None of the reviewed studies described the pressure parameters used. However, 9 of the 33 reviewed studies used aspiration, and none reported complications, such as mucosal injury during the procedure. On the other hand, two of the three studies that excluded samples contaminated with blood were aspiration based^{8,11}. Unlike suction, the method described by Ng et al. used swabs, which was well tolerated by PTNs as they did not demonstrate any sign of discomfort during collection. The authors found no adverse effects, and 85% of the samples contained an adequate amount of saliva.⁴⁶

Absorbent material was the method of choice for saliva collection, used by 23 of the 33 reviewed studies. The materials included cotton buds, pediatric swabs^{10,45}, or eye sponges^{14,44} of various brands. The authors of two studies split the swab in four parts² or in half, attaching it to a cotton bud⁴⁹ to reduce its size and fit more comfortably in the PTNs' mouths. Other absorbent materials used by the studies were filter paper^{13,55,56} and sterile dental cotton rolls.⁵⁷

Morelius 2006 assessed plastic and wooden shaft swabs immediately after collection, 24 h after collection, and 48 h after collection. Mean salivary cortisol was significantly lower in wooden shaft swabs 24 h (40%, p 0.001) and 48 h (49%, p 0.001) after collection than in wooden shaft swabs immediately after collection. However, the cortisol levels in samples collected with plastic shaft swabs did not differ. Hence, the authors recommend not to use both types of swabs in the same trial and to avoid using wooden shaft swabs as wood may absorb cortisol.⁵⁹

Twenty-one studies lost some samples due to insufficient saliva and/or blood contamination. Sometimes collecting an adequate amount of saliva is a challenge as the mucosa of some PTNs is extremely dry⁴², especially in PTNs receiving anticholinergic agents, that is,

mydriatic agents⁵³. There is also loss caused by evaporation while the sample is frozen for storage or thawed for analysis.⁴²

Most studies used centrifugation to extract saliva from the absorbent materials. Such studies used Eppendorf® tubes^{41,42} or Salimetrics® tubes^{2,10}, which contain a separate compartment to store saliva and keep it separated from the absorbent material after centrifugation. Ashwood et al. used sterile dental cotton rolls to absorb saliva and then extracted the saliva by placing the roll inside a 5 ml syringe barrel and pressing the plunger top.⁵⁷

Inadequate saliva volume for the assay, the most common cause of sample loss, may be directly related to the type of assay chosen to measure cortisol as different assays require different amounts of sample. Studies that use assays that require smaller volumes are less likely to lose samples due to inadequate saliva volume. An advantage of using aspiration is the possibility of placing the saliva in a graduated container, which allows immediate awareness of the amount collected. Thus, collection time may be increased until the necessary amount is collected. On the other hand, saliva collected by absorbent materials can only be quantified after centrifugation or extraction by some other means, which is usually done some time after collection. None of the reviewed aspiration-based studies reported collection time while 68.2% (15 out of 22) of the absorption-based studies did (Table 2).

Some studies have not found an association between plasma and salivary cortisol levels^{10,45}, but other studies have^{7,49,50}. Regardless of this correlation, salivary cortisol increases in individuals submitted to stressful situations^{7,60}. Moreover, almost all studies reviewed herein managed to measure cortisol in at least part of the samples, regardless of saliva collection method, suggesting that this procedure is useful but not yet standardized.

LIMITATIONS

Although three databases were searched, this review may have missed studies compliant with the inclusion and exclusion criteria. The data in some reviewed studies may have been misinterpreted as they were not clear.

This review only included studies published in the last 10 years because collection materials have changed significantly and many studies were published during this period. Thus, earlier studies may contain important data not included herein.

CONCLUSION

Salivary cortisol measurement in preterm newborns may be useful for assessing and comparing the level of stress generated or relieved by different stimuli. Saliva collection methods have not been standardized, preventing the reproduction of studies that use these methods.

REFERENCES

1. Asadollahi M, Jabraeili M, Mahallei M, Asgari Jafarabadi M, Ebrahimi S. Effects of gentle human touch and field massage on urine cortisol level in premature infants: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *J Caring Sci.* 2016;5(3):187-94.
2. Schwilling D, Vogeser M, Kirchhoff F, Schwaiblmair F, Boulesteix AL, Schulze A, et al. Live music reduces stress levels in very low-birthweight infants. *Acta Paediatr.* 2015;104(4):360-7.
3. Ahmed RG, Suliman GI, Elfakey WA, Salih KM, El-Amin EI, Ahmed WA, et al. Effect of tactile kinesthetic stimulation on preterm infants' weight and length of hospital stay in Khartoum, Sudan. *Saudi Med J.* 2015;36(2):196-9.
4. Conde-Agudelo A, Diaz-Rossello JL. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016(8):Cd002771.
5. Lyngstad, Lene Tandle, Tandberg BS, Storm H, Ekeberg BL, Moen A. "Does skin-to-skin contact reduce stress during diaper change in preterm infants?." *Early Hum Dev.* 90.4 (2014): 169-172.
6. Morelius E, Hellstrom-Westas L, Carlén C, Norman E, Nelson N. Is a nappy change stressful to neonates? *Early Hum Dev.* 2006;82(10):669-76.
7. Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE, Jr. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J Pediatr.* 2002;140(1):116-8.
8. Soliman H, Elsharkawy A, Abdel-Hady H. Does topical lidocaine reduce the pain associated with the insertion of nasal continuous positive airway pressure prongs in preterm infants?: A randomized, controlled pilot trial. *Clin J Pain.* 2016;32(11):948-54.
9. Castral TC, Warnock F, Dos Santos CB, Dare MF, Moreira AC, Antonini SR, et al. Maternal

mood and concordant maternal and infant salivary cortisol during heel lance while in kangaroo care. *Eur J Pain*. 2015;19(3):429-38.

10. Moore TA, Schmid KK, French JA. Comparison of cortisol samples in the first two weeks of life in preterm infants. *J Pediatr Endocr Met*. 2015;28(3-4):415-20.

11. Osman M, Elsharkawy A, Abdel-Hady H. Assessment of pain during application of nasal-continuous positive airway pressure and heated, humidified high-flow nasal cannulae in preterm infants. *J Perinatol*. 2015;35(4):263-7.

12. Schwilling D, Vogeser M, Kirchhoff F, Schwaiblmair F, Boulesteix AL, Schulze A, et al. Live music reduces stress levels in very low-birthweight infants. *Acta Paediatr*. 2015;104(4):360-7.

13. Mitchell A, Chang J, Yates C, Hall RW. Challenges, guidelines, and systemic review of salivary cortisol research in preterm infants. *e-Journal Neonatol Res*. 2012;2.

14. Maas C, Ringwald C, Weber K, Engel C, Poets CF, Binder G, et al. Relationship of salivary and plasma cortisol levels in preterm infants: results of a prospective observational study and systematic review of the literature. *Neonatology*. 2014;105(4):312-8.

15. Steen E, Bonamy AK, Norman M, Hellstrom-Westas L. Preterm birth may be a larger risk factor for increased blood pressure than intrauterine growth restriction. *Acta Paediatr*. 2015;104(11):1098-103.

16. Gover A, Brummelte S, Synnes AR, Miller SP, Brant R, Weinberg J, et al. Single course of antenatal steroids did not alter cortisol in preterm infants up to 18 months. *Acta Paediatr*. 2012;101(6):604-8.

17. Gover A, Chau V, Miller SP, Brant R, McFadden DE, Poskitt KJ, et al. Prenatal and postnatal inflammation in relation to cortisol levels in preterm infants at 18 months corrected age. *J Perinatol*. 2013;33(8):647-51.

18. Mehler K, Ulbrich L, Borner S, Joachim A, Becker I, Roth B, et al. Multidimensional response to vaccination pain in very preterm, moderate- to-late preterm and full-term infants at age three months. *Early Hum Dev*. 2015;91(3):199-204.

19. Haley DW, Weinberg J, Grunau RE. Cortisol, contingency learning, and memory in preterm and full-term infants. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31(1):108-17.

20. De Jong M, Cranendonk A, Van Weissenbruch MM. Salivary and serum cortisol and relation to blood pressure in infancy and early childhood in very-low-birth-weight infants.

Pediatr Res. 2015;78(4):476-9.

21. White-Traut RC, Schwertz D, McFarlin B, Kogan J. Salivary cortisol and behavioral state responses of healthy newborn infants to tactile-only and multisensory interventions. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2009;38(1):22-34.

22. Nolan A, Lawrence C. A pilot study of a nursing Intervention protocol to minimize maternal-infant separation after cesarean birth. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2009;38(4):430-42.

23. Morelius E, Ortenstrand A, Theodorsson E, Frostell A. A randomised trial of continuous skin-to-skin contact after preterm birth and the effects on salivary cortisol, parental stress, depression, and breastfeeding. *Early Hum Dev*. 2015;91(1):63-70.

24. Róka A, Beko G, Halász J, Toldi G, Lakatos P, Azzopardi D, et al. Changes in serum cytokine and cortisol levels in normothermic and hypothermic term neonates after perinatal asphyxia. *Inflamm Res*. 2013;62(1):81-7.

25. Aucott SW, Watterberg KL, Shaffer ML, Donohue PK. Early cortisol values and long-term outcomes in extremely low birth weight infants. *J Perinatol*. 2010;30(7):484-8.

26. Parga JJ, Harper RM, Karp H, Kesavan K, Zeltzer L. Low frequency rhythmic womb-like sounds modify autonomic activity in premature neonates. *J Invest Med*. 2016;64(1):159-60.

27. Hurron EM, Harris M, Gray PG. Preterm-born children display altered hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPAA) function and this is associated with infant temperament and 2-year cognitive and language scores. *J Paediatr Child Health*. 2014;50:50-1.

28. Ng SM, Turner M, Drury J, Didi M, Victor S, Newland P, et al. Correlation of early morning plasma cortisol and salivary cortisol in extremely premature infants. *Horm Res Paediatr*. 2012;78:218.

29. Van der Voorn B, de Waard M, van Goudoever JB, Rotteveel J, Heijboer AC, Finken MJ. Breast-Milk Cortisol and Cortisone Concentrations Follow the Diurnal Rhythm of Maternal Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *J Nutr*. 2016;146(11):2174-9.

30. Ak J, Lakshmanagowda PB, G CMP, Goturu J. Impact of music therapy on breast milk secretion in mothers of premature newborns. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):Cc04-6.

31. Saatsaz S, Rezaei R, Sharifnia SH, Kheirkhah F, Mouloukzadeh M, Haji Hosseini F. Effect of mother and newborn skin to skin contact on postpartum blues. *J Babol Univ Med Sci*. 2011;13(3):60-5.

32. Ludington-Hoe SM. Skin-to-skin contact: A comforting place with comfort food. *Am J Matern Child Nurs.* 2015;40(6):359-66.
33. Hochwald O, Holsti L, Osiovič H. Early testing for adrenal dysfunction in very low birth weight premature newborns. *Paediatr Child Health.* 2011;16:7A-9A.
34. Badiie Z, Nassiri Z, Armanian A. Cobedding of twin premature infants: calming effects on pain responses. *Pediatr Neonatol.* 2014;55(4):262-8.
35. Candia MF, Osaku EF, Leite MA, Toccolini B, Costa NL, Teixeira SN, et al. Influence of prone positioning on premature newborn infant stress assessed by means of salivary cortisol measurement: pilot study. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2014;26(2):169-75.
36. Badiie Z, Asghari M, Mohammadizadeh M. The calming effect of maternal breast milk odor on premature infants. *Pediatr Neonatol.* 2013;54(5):322-5.
37. Gibbins S, Stevens B, Beyene J, Chan PC, Bagg M, Asztalos E. Pain behaviours in Extremely Low Gestational Age infants. *Early Hum Dev.* 2008;84(7):451-8.
38. Ribeiro LM, Castral TC, Montanholi LL, Dare MF, Silva AC, Antonini SR, et al. [Human milk for neonatal pain relief during ophthalmoscopy]. *Rev Esc Enferm USP.* 2013;47(5):1039-45.
39. Cabral DM, Antonini SR, Custodio RJ, Martinelli CE, Jr., da Silva CA. Measurement of salivary cortisol as a marker of stress in newborns in a neonatal intensive care unit. *Horm Res Paediatr.* 2013;79(6):373-8.
40. Bauer J, Teufel U, Maser-Gluth C, Doege C. Effects of budesonide inhalation on energy expenditure, somatic growth and salivary cortisol levels in preterm infants with chronic lung disease. *Horm Res.* 2009;72(3):146-52.
41. Campbell-Yeo ML, Johnston CC, Joseph KS, Feeley N, Chambers CT, Barrington KJ, et al. Co-bedding between preterm twins attenuates stress response after heel lance: Results of a randomized trial. *Clin J Pain.* 2014;30(7):598-604.
42. Dorn F, Wirth L, Gorbey S, Wege M, Zemlin M, Maier RF, et al. Influence of acoustic stimulation on the circadian and ultradian rhythm of premature infants. *Chronobiol Int.* 2014;31(9):1062-74.
43. Klingenberg C, Pettersen M, Hansen EA, Gustavsen LJ, Dahl IA, Leknessund A, et al. Patient comfort during treatment with heated humidified high flow nasal cannulae versus nasal continuous positive airway pressure: a randomised cross-over trial. *Arch Dis Child Fetal*

Neonatal Ed. 2014;99(2):F134-7.

44. Mitchell AJ, Yates CC, Williams DK, Chang JY, Hall RW. Does daily kangaroo care provide sustained pain and stress relief in preterm infants? *J Neonatal Perinatal Med.* 2013;6(1):45-52.

45. Moore TA, Wilson ME, Schmid KK, Anderson-Berry A, French JA, Berger AM. Relations between feeding intolerance and stress biomarkers in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57(3):356-62.

46. Ng SM, Drury JA, Turner MA, Didi M, Victor S, Newland P, et al. A novel method of collection of saliva for estimation of steroid levels in extremely premature infants. *Acta Paediatr.* 2013;102(4):356-9.

47. Ivars K, Nelson N, Finnstrom O, Morelius E. Nasopharyngeal suctioning does not produce a salivary cortisol reaction in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2012;101(12):1206-10.

48. Morelius E, Brostrom EB, Westrup B, Sarman I, Ortenstrand A. The Stockholm Neonatal Family-Centered Care Study: Effects on salivary cortisol in infants and their mothers. *Early Hum Dev.* 2012;88(7):575-81.

49. Chou IC, Lien HC, Lin HC, Fu JJC, Kao CH, Tsai CH, et al. The relationship of salivary and cord blood cortisol in preterm infants. *J Pediatr Endocr Met.* 2011;24(1-2):85-8.

50. Cong X, Ludington-Hoe SM, Walsh S. Randomized crossover trial of kangaroo care to reduce biobehavioral pain responses in preterm infants: a pilot study. *Biol Res Nurs.* 2011;13(2):204-16.

51. Cignacco E, Denhaerynck K, Nelle M, Buhner C, Engberg S. Variability in pain response to a non-pharmacological intervention across repeated routine pain exposure in preterm infants: a feasibility study. *Acta Paediatr.* 2009;98(5):842-6.

52. Schaffer L, Luzi F, Burkhardt T, Rauh M, Beinder E. Antenatal betamethasone administration alters stress physiology in healthy neonates. *Obstet Gynecol.* 2009;113(5):1082-8.

53. Kleberg A, Warren I, Norman E, Morelius E, Berg AC, Mat-Ali E, et al. Lower stress responses after Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program care during eye screening examinations for retinopathy of prematurity: a randomized study. *Pediatrics.* 2008;121(5):e1267-78.

54. Davis EP, Townsend EL, Gunnar MR, Guiang SF, Lussky RC, Cifuentes RF, et al.

Antenatal betamethasone treatment has a persisting influence on infant HPA axis regulation. *J Perinatol.* 2006;26(3):147-53.

55. Neu M, Hazel NA, Robinson J, Schmiede SJ, Laudenslager M. Effect of holding on co-regulation in preterm infants: a randomized controlled trial. *Early Hum Dev.* 2014;90(3):141-7.

56. Neu M, Laudenslager ML, Robinson J. Coregulation in salivary cortisol during maternal holding of premature infants. *Biol Res Nurs.* 2009;10(3):226-40.

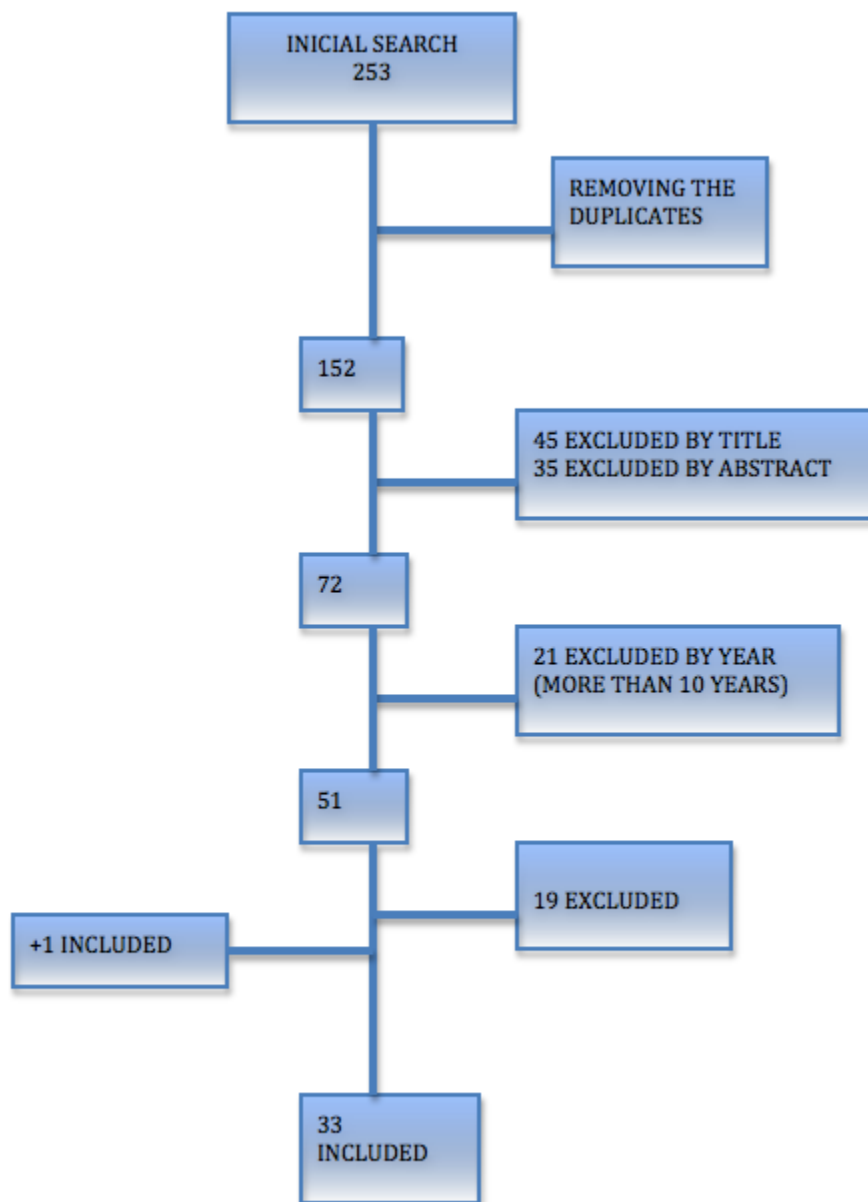
57. Ashwood PJ, Crowther CA, Willson KJ, Haslam RR, Kennaway DJ, Hiller JE, et al. Neonatal adrenal function after repeat dose prenatal corticosteroids: A randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(3):861-7.

58. Castral TC, Warnock FF, Ribeiro LM, de Vasconcelos MGL, Leite AM, Scochi CGS. Maternal factors regulating preterm infants' responses to pain and stress while in maternal kangaroo care. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2012;20(3):435-43.

59. Morelius E, Nelson N, Theodorsson E. Saliva collection using cotton buds with wooden sticks: a note of caution. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66(1):15-8.

60. Morelius E, He HG, Shorey S. Salivary Cortisol Reactivity in Preterm Infants in Neonatal Intensive Care: An Integrative Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(3)

FIGURE 1: FLOWCHART



Artigo 3

Dosagem de cortisol salivar pré e pós-estimulação tátil e cinestésica em recém-nascidos pré-termo: ensaio clínico randomizado e controlado

RESUMO

Objetivo: comparar os níveis de cortisol salivar, além da frequência respiratória, cardíaca e Saturação O₂ pré- e pós- a aplicação de estimulação tátil e cinestésica em recém-nascidos pré-termo durante o período de internação. **Metodologia:** ensaio clínico randomizado e controlado, cego, incluindo os recém-nascidos com peso ao nascer menor ou igual a 2.000g e idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, clinicamente estáveis há cinco dias. No grupo controle foi realizada troca de decúbito, semelhante ao outro grupo. Utilizou-se swab infantil para coleta de saliva, que foi centrifugado à 3.500 rpm por 15 min, logo após a segunda coleta, e armazenada à -80°C. **Análise Estatística:** para comparação das variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Para comparação das variáveis numéricas, dados basais das variáveis foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparação entre os tempos e grupos das variáveis cortisol, frequência cardíaca e respiratória, SatO₂ e temperatura utilizou-se análise de variância para medidas repetidas. **Resultados:** houve aumento dos níveis de cortisol pós- intervenção apenas no grupo controle (p= 0.0056). Em ambos os grupos: houve queda da frequência cardíaca (p=0.0260) e queda da frequência respiratória (p=0,0092) em momentos pós- intervenção comparando com momentos pré-. A Sat O₂ aumentou em ambos os grupos pós- intervenção comparada aos todos outros momentos (p=0.0115). **Conclusão:** A estimulação tátil e cinestésica aplicada no período de internação em recém-nascidos pré-termo parece não causar estresse, podendo amenizá-lo quando comparamos ao grupo que recebeu apenas a troca de decúbito.

Palavras Chaves: recém-nascidos pré-termo; estimulação tátil; estimulação cinestésica; cortisol salivar.

Dosage of salivary cortisol before and after tactile and kinesthetic stimulation in preterm newborns: randomized controlled trial

ABSTRACT

Objective: to compare salivary cortisol levels, besides respiratory rate, heart rate and O₂ saturation, before and after the application of tactile and kinesthetic stimulation in preterm newborns during the hospitalization period. Methodology: Randomized controlled trial, blind, including newborns with birth weight less than or equal to 2,000 g and gestational age less than or equal to 37 weeks, clinically stable for five days. In the control group there was a change of decubitus, similar to the other group. The infant swab for saliva collection was used, which was centrifuged at 3500 rpm for 15 min, shortly after the second collection, and stored at -80 ° C. Statistical Analysis: Chi-square test and, when necessary, Fisher's exact test were used to compare the categorical variables. To compare the numerical variables, baseline data of the variables were used the Mann-Whitney test. For comparison between the times and groups of the variables cortisol, heart rate and respiratory, SatO₂ and temperature was used analysis of variance for repeated measures. Results: there was an increase in post-intervention cortisol levels only in the control group ($p = 0.0056$). In both groups, there was a decrease in heart rate ($p = 0.0260$) and a decrease in respiratory frequency ($p = 0.0092$) at the post-intervention moments comparing with pre-hours. Sat O₂ increased in both postintervention groups compared to all other moments ($p = 0.0115$). Conclusion: tactile and kinesthetic stimulation seems not to cause preterm newborn stress, since there was no increase in cortisol as occurred in the control group, which received only the change of decubitus.

Key words: preterm newborns; tactile stimulation; kinesthetic stimulation; salivary cortisol.

INTRODUÇÃO

O simples manuseio de recém-nascidos pré-termo (RNPT) dentro do ambiente hospitalar já pode ser considerado estressante.¹ A intensidade desse estresse varia de acordo com o tipo de intervenção, porém mesmo uma troca de fralda já demonstrou causar respostas comportamentais semelhantes às de dor e aumento dos níveis cortisol salivar.²

Ensaio clínico utilizando a estimulação tátil e/ou estimulação cinestésica (ETC) aplicada em RNPT em unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) tem sido publicados desde 1960 e observou-se melhora do ganho de peso³⁻⁷, redução no período de internação^{4,6}, redução da ocorrência da sepse precoce⁸ e melhora da mineralização óssea⁹⁻¹¹, entre outros benefícios nos RNPT que receberam a ETC durante o período de internação. É um procedimento bastante simples, de baixo custo e não invasivo, já tendo sido demonstrada sua influência positiva também sobre o estresse em RNPT internados.¹²⁻¹⁵

Estudos recentes demonstraram a interferência da massagem em lactentes prematuros de baixo risco, sugerindo favorecimento de um processo de maturação da atividade elétrica cerebral similar ao observado (*in utero*) em lactentes a termo, provavelmente através de uma atenuação das discrepâncias entre ambientes extra e intra-uterino.¹⁶ Além de acelerar a maturação da atividade eletroencefalográfica e da função visual, em particular da acuidade visual, observou-se também níveis mais elevados de IGF-1 (*insuline-like growth factor 1*) no sangue, sugerindo que tais efeitos podem ser mediados por fatores endógenos.¹⁷ Aumento no IGF-1 pós ETC já havia sido observado em estudos anteriores.¹⁸

Respostas cardiovasculares, respiratórias e hormonais são os melhores métodos de avaliação para determinar o estresse em humanos.¹⁹ Métodos não invasivos para avaliação da eficácia de terapias complementares que visam auxiliar na diminuição do estresse dentro das UTIN (como musicoterapia²⁰ estimulação tátil e cinestésica²¹, método canguru²², pele a pele²³), tem sido aplicados em vários estudos recentes, dentre eles dosagem do cortisol salivar, uma vez que os níveis de cortisol podem ser detectados na saliva desde a primeira semana de vida.²⁴ Numa revisão feita em 2010, Mitchell conclui que a coleta de saliva de recém-nascidos pré-termo é uma excelente forma de avaliar a dor e o estresse, mesmo sendo difícil a obtenção do volume adequado para análise.²⁵

Desta forma, desenvolvemos um ensaio clínico com o objetivo de comparar os níveis de cortisol salivar, bem como alterações da frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e Saturação de oxigênio (SatO₂) pré- e pós- a aplicação de ETC em RNPT durante o período de internação em UTIN, verificando a efetividade e segurança da técnica.

METÓDOS

O estudo foi um ensaio clínico randomizado, controlado e cego, desenvolvido numa UTIN humanizada, do Hospital do CAISM – UNICAMP, Campinas- SP. A coleta de dados para o ensaio clínico foi realizada de junho de 2016 até março de 2017. Os critérios de seleção foram RN pré-termo com peso ao nascer menor ou igual a 2.000g e idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, que estivessem clinicamente estáveis há pelo menos 5 dias, em ar ambiente, em incubadora ou berço aquecido. Consideramos critérios de exclusão: síndromes genéticas, malformações congênitas, alimentação contínua por sonda ou transpilórica, infecções congênitas, fraturas, uso de medicamentos (miconazol oral e corticóide), lesões descamativas de pele, precaução de contato, asfixia perinatal, hemorragia perintraventricular grau III e IV. O procedimento seria descontinuado caso ocorressem alterações cardiorrespiratórios como (FC >180bpm ou < 80 bpm; FR > 60ipm e SatO₂ < 86%) durante a intervenção, choro intenso ou qualquer sinal de desconforto importante para o RN, que não tivesse retorno rápido e espontâneo. Foram incluídos 33 RNPT.

CÁLCULO AMOSTRAL

Para o cálculo do tamanho amostral, a média e desvio padrão dos níveis basais foram estimados a partir dos valores da mediana, mínimo e máximo, obtidos no estudo *Influence of prone positioning on premature newborn infant stress by means of salivary cortisol measurement: pilot study*. Considerando um nível de 5% de significância e um poder de 80% seriam necessários, no mínimo, 17 RN para mostrar que há diferença no nível de cortisol quando comparado o nível basal com pós- posição prona.

VARIÁVEIS DEPENDENTES

Foram analisadas FR, FC, SatO₂, temperatura corpórea, níveis de cortisol salivar.

• DOSAGEM DE CORTISOL SALIVAR

A primeira amostra de saliva foi coletada uma hora após a mamada da manhã (5/6h), antes de iniciar a intervenção. Utilizou-se o *SalivaBio Infant's Swab*[®] (SIS), da marca Salimetrics, que é um *swab* específico para crianças com menos de seis meses; a pesquisadora fez leves movimentos circulares, percorrendo toda a mucosa oral, por 10 min. O *swab* era colocado imediatamente após a coleta no *Swab Storage Tube*[®], também da marca Salimetrics (o qual possui um compartimento que separa a saliva do *swab*, sendo que após a centrifugação, a parte aonde fica o *swab* é descartada), devidamente etiquetados com a identificação do RN e o momento de coleta (pré- ou pós- intervenção). A primeira amostra permanecia na centrífuga à 4°C por mais ou menos uma hora, até que a segunda amostra fosse coletada.

A segunda amostra foi coletada após 30 min do término da intervenção e levada imediatamente ao laboratório. Ambas foram centrifugadas, na *Eppendorf Centrifuge 5810R*, à 3.500rpm por 15 min em temperatura de 4°C e imediatamente após centrifugação armazenadas em caixas próprias à -80°C por até nove meses. Para a dosagem, utilizou-se o Método de Elisa do tipo competitivo, feita pelo laboratório Science Pro - São Paulo. A quantidade mínima de saliva necessária para a realização da dosagem foi de 25 microlitros, sendo que das 66 amostras de saliva coletadas, apenas uma não apresentou volume mínimo.

• TEMPERATURA, FR, FC E SAT O₂

A FC, FR e SatO₂ foram medidas antes do início da primeira coleta de saliva, imediatamente antes da ETC/troca de decúbito, imediatamente após a ETC/troca de decúbito e após a segunda coleta de saliva. A temperatura foi aferida antes da primeira coleta, imediatamente após o término da ETC/troca de decúbito e após a segunda coleta de saliva, como precaução à perda de calor pela manutenção da incubadora aberta durante o procedimento (15min ETC, 10min coleta de saliva).

VARIÁVEL INDEPENDENTE

• ESTIMULAÇÃO TÁTIL E CINESTÉSICA

A ETC proposta, seguiu o protocolo descrito por Field em 1986,²⁶ composto por três fases padronizadas com duração de 5 minutos cada fase - estimulação tátil durante a primeira e a terceira fases e estimulação cinestésica durante a fase intermediária. Utilizou-se vaselina líquida para auxiliar no deslizamento da mão do terapeuta sobre a pele do RN, que deveria estar apenas

de fralda. A quantidade de vaselina líquida utilizada para o procedimento variou entre 3 a 5 gotas por paciente, sendo colocada nas mãos do terapeuta e não diretamente na pele do RN. A pressão utilizada para a fase tátil foi moderada, dosada pela mudança ligeira de cor da pele do branco ao rosa, ou por recuos ligeiros na pele do RN. Os RN, do grupo 1 (caso), foram massageados por 5 períodos de 1 minuto ao longo de cada região (contando da seguinte forma: 5 segundos ida e 5 segundos volta de cada região, repetindo por 6 vezes, o que resulta em 60 segundos em cada região), na seguinte sequência:

- 1) a partir do topo da cabeça até o pescoço e volta para o topo da cabeça;
- 2) a partir do pescoço para os ombros e volta para o pescoço;
- 3) a partir da parte superior das costas até a cintura e de volta à parte superior das costas;
- 4) a partir da coxa até o pé e volta para a coxa, em ambas as pernas e
- 5) a partir do ombro até a mão e volta para o ombro, em ambos os braços.

Durante a fase de estimulação cinestésica, o RN foi colocado em supino e recebeu 6 movimentos passivos de flexão (5 segundos) e extensão (5 segundos) dos membros, sendo 1 minuto para cada braço e cada perna, e, finalmente, nas duas pernas juntas (5 minutos no total). Em seguida, o RN foi colocado novamente em decúbito ventral para receber a terceira fase (estimulação tátil), exatamente como a primeira fase.

O grupo controle (grupo 2) recebeu a troca de decúbito, aplicada na mesma sequência de mudanças de decúbito do grupo caso (primeiros 5 min em DV, depois 5 min em DD, e finalmente os últimos 5 min em DV). Em ambos os grupos, o RN permaneceu em DV por 30 min após o término do procedimento.

VARIÁVEIS DESCRITIVAS

Foram analisados peso ao nascer, idade gestacional, adequação do peso para idade gestacional, sexo, idade pós-natal no dia da intervenção, uso de cafeína, se a mãe fez uso de droga (como álcool, cigarro, maconha) antes ou durante a gestação, intercorrências durante o procedimento, fototerapia com término há menos de cinco dias da coleta, e se houve sucção nutritiva ou não nutritiva no dia anterior.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e estatísticas descritivas das variáveis numéricas, com valores de média, desvio padrão, valores mínimo, máximo e mediana.

Para comparação das variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Para comparação das variáveis numéricas e dados basais das variáveis foi utilizado o teste de Mann-whitney. Para comparação entre os tempos e grupos das variáveis Cortisol, FC, FR, SAT O2 e temperatura foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas. Os dados foram transformados em postos (ranks). O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%.

CONTROLE DE QUALIDADE

Randomização foi feita em blocos, indicada em casos de pequenas amostras, utilizando envelopes pardos, lacrados, onde estavam o número do sujeito no estudo e o grupo ao qual ele pertenceria, caso ou controle. Esses envelopes só foram abertos no dia do procedimento.

Quanto à intervenção, foi feita sempre pela mesma terapeuta, que fez o treinamento com a equipe da Dra. Field, no Touch Research Institutes, sempre no mesmo período (1h após a mamada da 5/6h manhã), com quantidade semelhante de vaselina quando aplicada a ETC (3 a 5 gotas). Além disso, um projeto piloto foi realizado, na forma de ensaio clínico randomizado e controlado, com 10 RNPT nascidos com peso menor ou igual a 1.500g, internados na unidade de cuidados intermediários e estáveis há pelo menos 10 dias, aplicando a ETC uma vez por dia, durante cinco dias seguidos em cada RN, e foram avaliados: peso, tempo de internação, frequência cardíaca, frequência respiratória, saturação de oxigênio e temperatura. Durante esse período, observou-se intercorrências que aconteceram durante a aplicação do procedimento e os ajustes necessários foram feitos na metodologia para que houvesse padronização na forma de aplicação.

O laboratório que realizou a dosagem do cortisol, assim como os responsáveis pelo cálculo estatístico, o fizeram de forma cega, não sabiam qual era o grupo caso ou grupo controle, nem mesmo qual era a intervenção que estava sendo estudada.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi devidamente apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP, com registro na Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos-ReBEC {<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>} CAAE 44635015.0.0000.5404. Todos os participantes tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo responsável, segundo a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram, feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas, com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo e mediana. Para comparação das variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Para comparação das variáveis numéricas, dados basais das variáveis foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparação entre os tempos e grupos das variáveis cortisol, FC, FR, Sat O₂ e temperatura utilizou-se a ANOVA para medidas repetidas. Os dados foram transformados em postos (*ranks*). O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%.

Os grupos foram considerados homogêneos em relação às variáveis categóricas e em relação às variáveis numéricas. O N total foi de 33 RN, sendo 15 no grupo caso e 17 no grupo controle. Durante a realização do ensaio clínico, como precaução à perda das amostras por quantidade insuficiente de saliva para dosagem de cortisol, após a centrifugação foi realizada uma análise subjetiva através da observação da quantidade de saliva aparente no tubo coletor e, se essa quantidade de saliva extraída parecesse ser insuficiente, nova coleta fora feita no dia seguinte, se possível (pois o RN poderia ter alta ou ser transferido de hospital, ou ainda passar para berço comum). A perda foi de 1,5% já que 65 das 66 amostras contiveram quantidade suficiente de saliva para dosagem dos níveis de cortisol. Porém, o único caso que não obteve a quantidade necessária para dosagem (pertencente ao grupo 1=caso), não foi refeito pois o RN foi transferido para berço comum no mesmo dia, inviabilizando nova coleta.

Tabela 1: Distribuição percentual das variáveis categóricas descritivas da amostra

VARIÁVEIS CATEGÓRICAS	GRUPO 1 CASO	GRUPO 2 CONTROLE	P-VALOR
Adequação peso/idade			
AIG	18	35	0,4384*
PIG	81	64	
Sexo			
Masculino	37	47	0,5787
Feminino	62	52	
Uso de cafeína			
Sim	31	29	1,000*
Não	68	70	
Mãe usuária de droga			
Sim	13	33	0,3575*
Não	86	66	
Intercorrência ETC			
Sim	18	11	0,6562*
Não	81	88	
Fototerapia			
Sim	31	41	0,5536
Não	68	58	
Sucção não nutritiva			
Sim	81	76	1,000*
Não	18	23	
Sucção nutritiva			
Sim	18	11	0,6562*
Não	81	88	

*Qui quadrado/*teste exato de fisher); ETC= estímulo tátil cinestésico ; AIG= adequado para idade gestacional ; PIG=pequeno para idade gestacional*

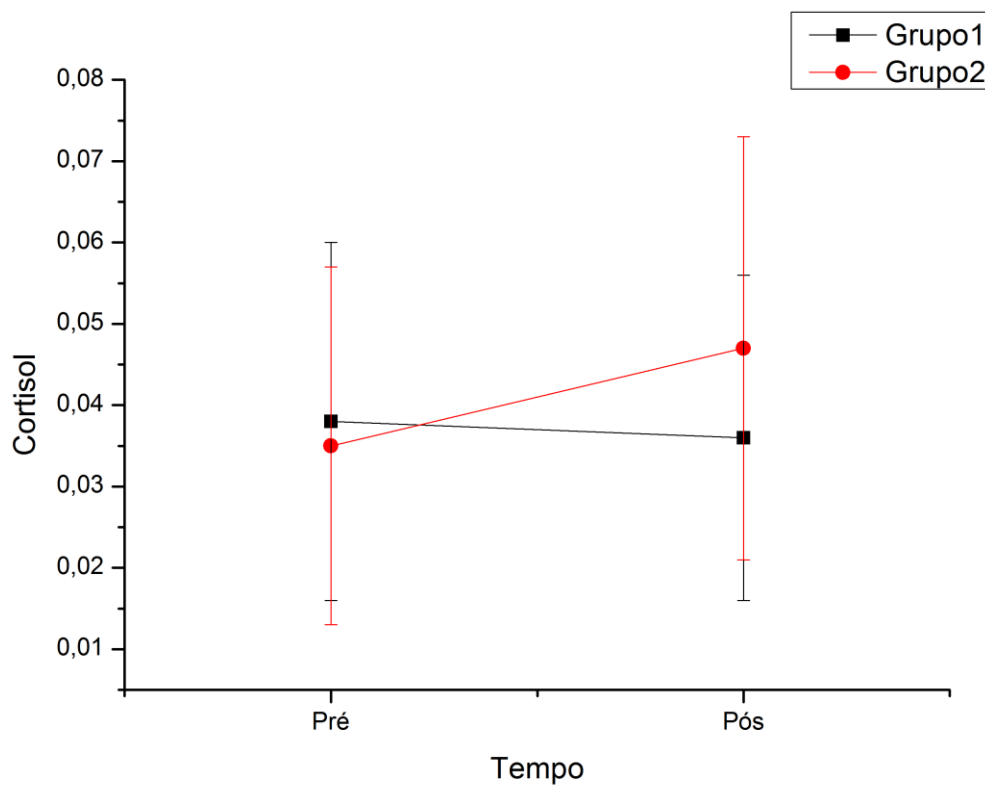
Tabela 2: Distribuição das variáveis numéricas descritivas da amostra

Grupo	Variável	Média	Mediana	D.P.	Mín	Máx	P-valor
1	Peso nasc	1497.8	1595.0	293.18	915.00	1950.0	0.6655
	Idade gest.	31.87	33.00	2.17	29.00	34.00	0.8406
	Idade pós nat	18.63	16.00	11.60	6.00	50.00	0.4810
	Peso proc	1680.6	1652.5	284.91	1280.0	2535.0	0.7731
2	Peso nasc	1574.7	1540.0	221.48	1245.0	1975.0	
	Idade gest.	31.67	31.00	2.50	28.00	36.00	
	Idade pós nat	15.41	13.00	8.71	6.00	36.00	
	Peso proc	1677.6	1605.0	264.93	1340.0	2385.0	

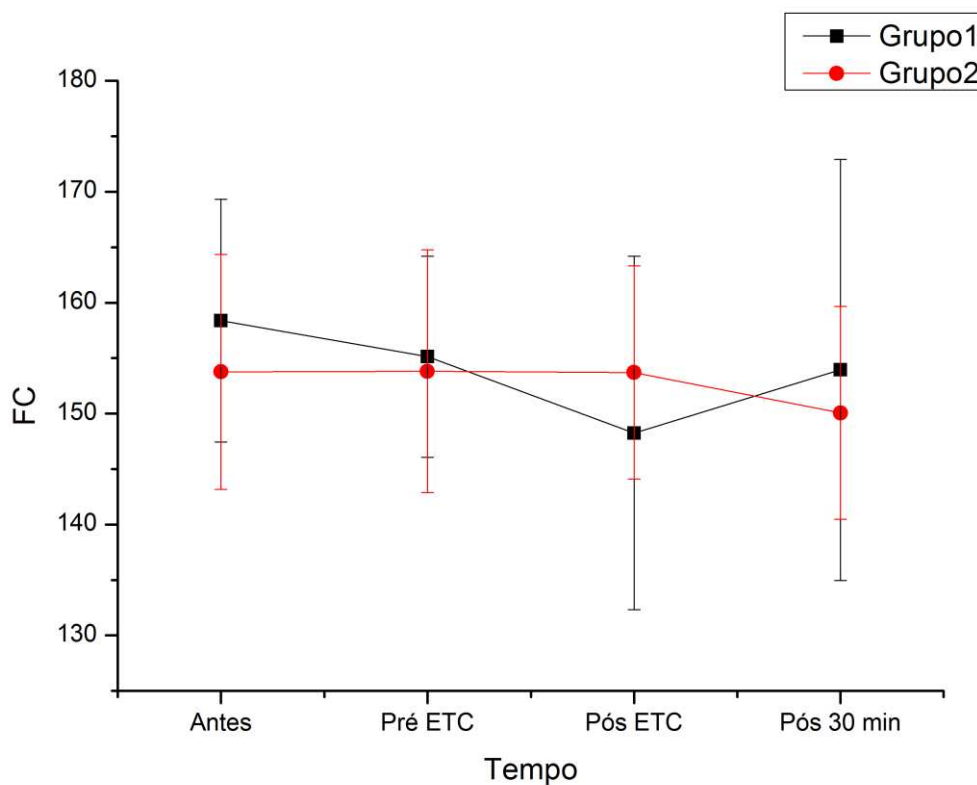
Peso nasc: peso ao nascer; Idade gest: idade gestacional; Idade pós nat: idade pós natal no dia do procedimento; Peso proc: peso no dia do procedimento.

As variáveis do desfecho principal do projeto, cortisol, FC, FR, Sat O₂ e temperatura foram comparadas em tempos: pré-coleta de saliva, pré- intervenção (ETC/troca de decúbito), imediatamente pós- intervenção e pós- a segunda coleta de saliva realizada após 30 min do término da intervenção) e entre grupos (comparando grupo 1= caso com grupo 2=controle).

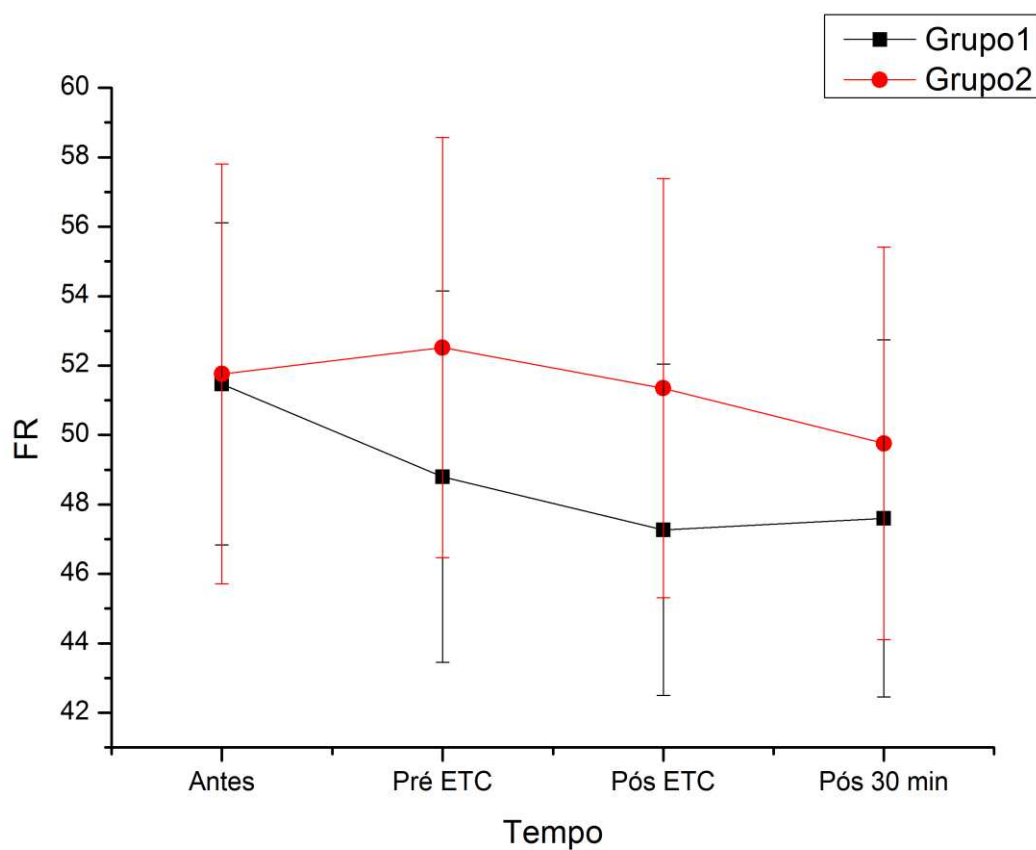
Os níveis de cortisol pré- intervenção estavam semelhantes considerando ambos os grupos; entretanto houve aumento significativo nos níveis do cortisol pós- comparado ao pré- apenas no grupo controle (grupo 2) ($p= 0.0056$) (FIGURA 1/ANEXO 1). Esta foi a única variável que apresentou diferença com significância estatística entre os grupos.

FIGURA 1: Resultado dos níveis de cortisol conforme o tempo em cada grupo

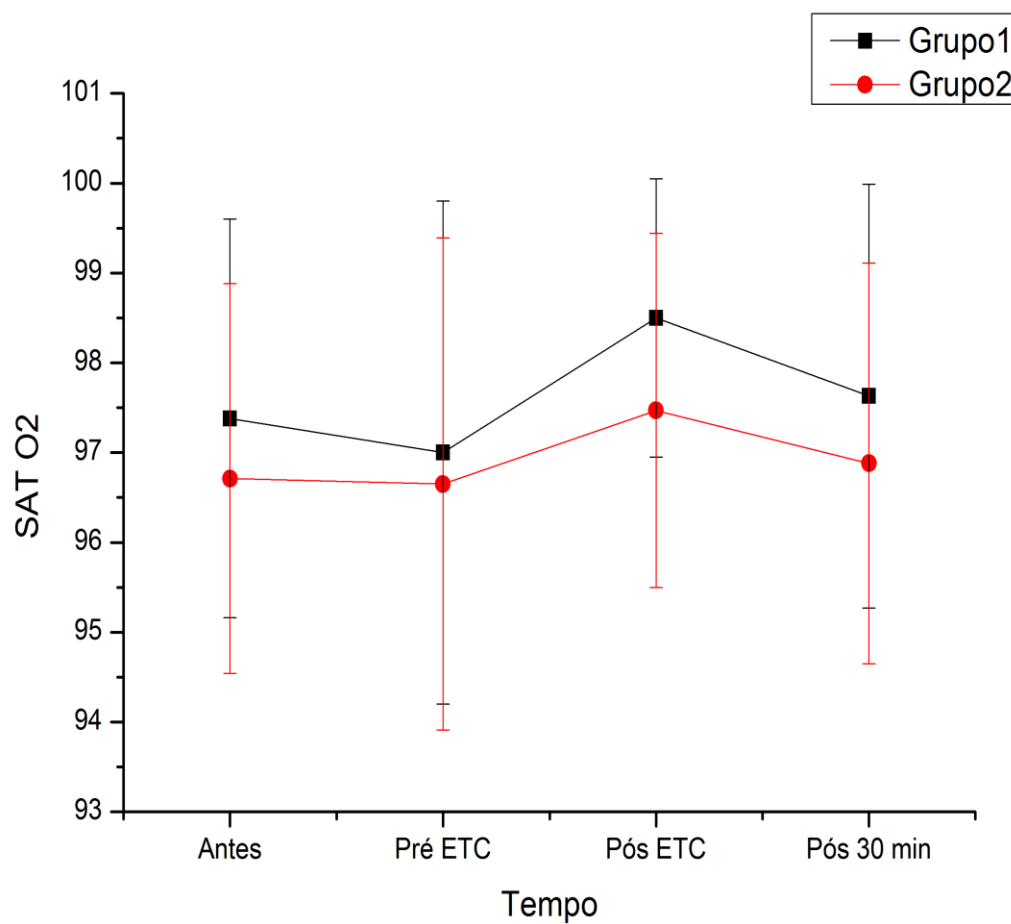
No caso da FC, não se pode considerar que houve diferença entre os grupos ($p=0,051$). Porém, quando comparamos os diferentes momentos em ambos os grupos, houve diminuição em dois tempos: quando comparamos antes da coleta de saliva e pós- ETC/troca de decúbito; e comparando pré- e pós- ETC/troca de decúbito ($p=0.0260$). (FIGURA 2/ANEXO 2)

FIGURA 2: Resultado da frequência cardíaca no tempo em ambos os grupos

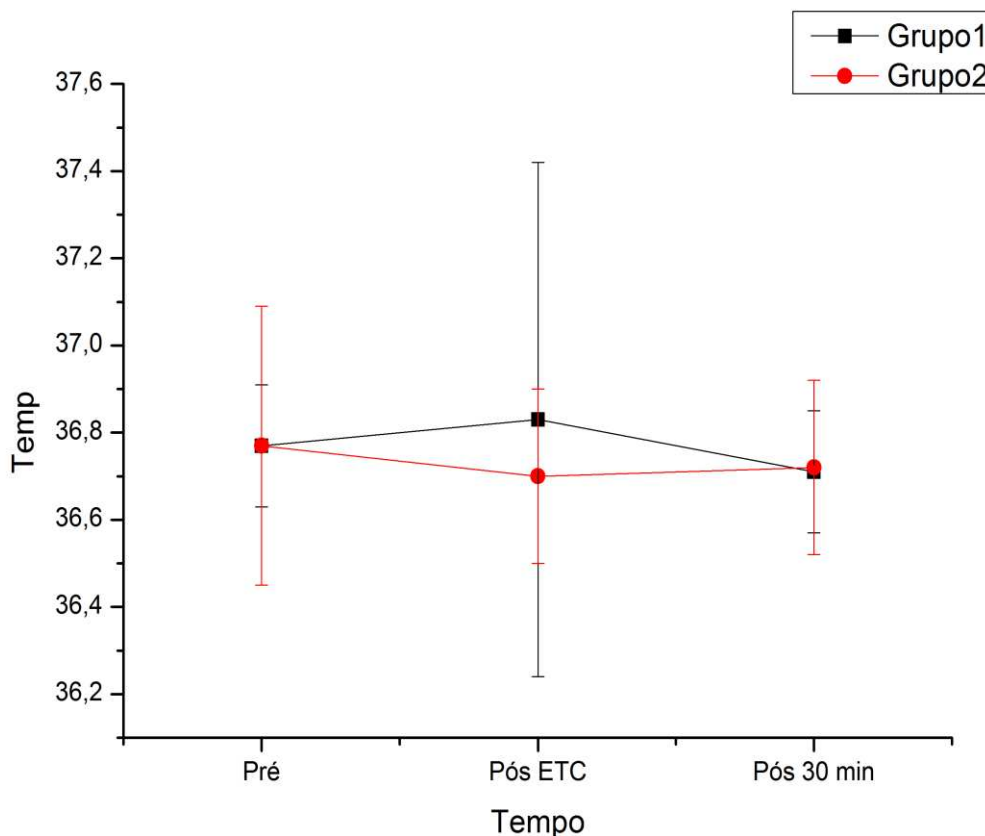
Avaliando a FR em ambos os grupos, houve queda em três momentos: pós- ETC/troca de decúbito e pós- segunda coleta de saliva, quando comparamos com antes da primeira coleta de saliva; e pós- segunda coleta de saliva comparando com pré- ETC/troca de decúbito. ($p=0.0092$) (FIGURA 3 /ANEXO3)

FIGURA 3: Resultado da frequência respiratória no tempo em ambos os grupos

Já a Sat O₂ aumentou significativamente em ambos os grupos pós- ETC/troca de decúbito quando comparada com todos os outros momentos ($p=0.0115$). (FIGURA 4/ ANEXO 4)

FIGURA 4: Resultado da Sat O₂ no tempo em ambos os grupos

A temperatura não apresentou diferença com significância estatística, nem em tempo nem entre grupos. (FIGURA 5/ANEXO5)

FIGURA 5: Resultado da temperatura corporal no tempo em ambos os grupos

Durante a coleta e procedimento foram observados sinais de incômodo como choro leve, caretas, aumento de FC com retorno rápido principalmente nas trocas de decúbito. Apenas dois casos apresentaram choro mais intenso, sendo um do grupo ETC (choro intenso com aumento de FC=189bpm durante a mudança da fase 2 pra fase 3 da ETC) e um do grupo controle (com queda de $\text{SatO}_2 = 73\%$, da fase 1 pra fase 2 durante a troca de decúbito); nesses casos o procedimento foi interrompido e refeito no dia seguinte, sendo que os dados coletados no primeiro dia não foram utilizados para cálculo estatístico. Em dois casos houve necessidade de higienização oral pré- coleta de saliva, pela presença de resíduo leitoso, também um RN pertencente a cada grupo. Os demais, permaneceram dormindo ou tranquilos durante o período de coleta e intervenção. Sinais como espirros, movimentação de membros, movimentos de sucção, soluços não foram considerados intercorrências. Quanto ao posicionamento que os RN

estavam antes de iniciar a coleta, dois estavam em decúbito lateral (um do grupo ETC e um do grupo controle) e seis em decúbito dorsal (quatro do grupo ETC e dois do grupo controle); todos os demais estavam em decúbito ventral.

DISCUSSÃO

O uso de terapias complementares simples e não invasivas, aplicadas em RNPT durante o período de internação, geram uma série de benefícios, porém ainda existe a necessidade de evidências, por se tratar de uma população vulnerável.²⁸ Embora alguns autores não tenham encontrado correlação entre os níveis de cortisol salivar e plasmático,^{29,30} outros estudos demonstraram haver correspondência entre eles,³¹⁻³³ e independente de tal correlação, o aumento dos níveis de cortisol na saliva de RN submetidos a situações de estresse já foi demonstrado.^{31,34}

A concentração de cortisol salivar, bem como os outros parâmetros de estresse avaliados nesse estudo, podem sofrer influência de uma série de eventos e por isso houve especial preocupação quanto à verificação da homogeneidade dos grupos. A IG pode interferir em parâmetros como o cortisol salivar em RNPT. Badiie e col (2014) correlacionaram o aumento da idade gestacional com a maior redução da dor, além de diminuições no escore de dor (*PIPP-Premature Infant Pain Profile*), cortisol salivar e tempo de choro mais evidentes.³⁵ Segundo Morelius e col. RN a termo saudáveis desenvolvem um ritmo circadiano do cortisol, porém em RNPT, pela imaturidade do desenvolvimento, a produção e liberação do cortisol muitas vezes não ocorre de forma adequada, podendo dessa forma a idade pós natal influenciar nos valores de concentração do cortisol salivar.³⁶ O uso de drogas pela mãe durante ou previamente a gestação foi analisado, uma vez que níveis mais elevados cortisol RNPT expostos à cocaína podem apresentar níveis mais elevados cortisol, como demonstrado por Scafidi e col. em 1996.

37

A fototerapia também foi considerada como variável, se suspensa há menos 5 dias do dia da intervenção. Isso porque os efeitos adversos notificados da fototerapia em lactentes incluem efeitos térmicos, perda de fluidos e secreção hormonal alterada e ritmos biológicos dentre outros³⁸. Além disso, foram analisados parâmetros relacionados à rotina de uma UTIN, como visita da mãe/pai/familiar, considerando o dia anterior a realização do procedimento; se havia prescrição para sucção nutritiva ou não nutritiva e se o RNPT estava fazendo uso de

caféina, por conta da relação desta com aumento de FC.³⁹ Todas as variáveis analisadas apresentaram-se homogêneas entre os grupos.

Durante a coleta e procedimento os sinais de desconforto foram observados, surgindo com maior frequência no momento das trocas de decúbito, porém com retorno rápido e espontâneo. A temperatura foi medida em três momentos, mesmo já havendo estudos que demonstraram inclusive que pode haver aumento da temperatura após ETC, provavelmente pela transferência de calor do terapeuta ao RN.⁴⁰ Resultados semelhantes referente a melhora da SatO₂, queda da FR, e manutenção da temperatura corporal, foram demonstrados em grupos que empregaram o método canguru, o qual também dispõe desse contato benéfico com a pele do RN.⁴¹

A inclusão da troca de decúbito no grupo controle foi uma tentativa de isolar o procedimento de estimulação tátil e cinestésica propriamente dito, da troca de decúbito necessária para realização da ETC seguindo o protocolo adotado.²⁶ Estudos recentes demonstraram que o manuseio necessário aos cuidados padrão (troca de fralda por exemplo) aumentam significativamente respostas fisiológicas e comportamentais (NICAP[®]) como FR, FC, a frequência de condutância da pele e em RNPT durante os primeiros dias de vida, tanto quanto um procedimento doloroso como punção de calcâneo.^{42,43} Desta forma, não fazer qualquer manuseio no grupo controle seria um importante viés. Contudo, observou-se queda tanto da FC quanto da FR nos momentos imediatamente pós- ETC/troca de decúbito e pós-30min da intervenção comparando aos momentos anteriores. Desta forma, parece que a troca de decúbito não interferiu de maneira prejudicial nas respostas fisiológicas dos RNPT.

Estudos já demonstraram que a posição prono é capaz de ter efeito benéfico sobre o estado comportamental, melhora do sono, Sat O₂ e estresse;⁴⁴ mesmo feita a exposição aos estressores ambientais típicos de uma UTIN (ruído, luz e estimulação / manuseio), ainda assim a posição prono parece favorecer o sono e diminuir às respostas ao estresse comparada à posição supino. Ambos os grupos estudados permaneceram por 30min na posição prono após a ETC/troca de decúbito, porém o grupo que não recebeu a ETC teve aumento do cortisol salivar pós- quando comparado aos níveis pré-, sendo que os grupos foram considerados homogêneos em relação às dosagens de cortisol pré-. Tal resultado diverge de um estudos recente que observou queda do cortisol salivar após um tempo na posição a prono, além de queda da FR e do escore de sono de Brazelton, sugerindo a correlação entre essa postura e a diminuição do estresse em RNPT.²⁷

Uma das hipóteses para o aumento dos níveis de cortisol salivar no grupo controle seria que a ETC trouxe algum benefício que este grupo não teve, uma vez que a massagem terapêutica, além de proporcionar uma sensação agradável (pela liberação de serotonina), teoricamente diminui a tensão muscular, facilitando a remoção de resíduos metabólicos tóxicos (resultantes do exercício ou inatividade), e permitindo que mais oxigênio e nutrientes possam atingir as células e tecidos do corpo.⁴⁵ Devemos levar em consideração a comunicação multidirecional entre a pele, os sistemas endócrino, imunológico e do sistema nervoso central, sendo que a pele pode ser um importante regulador da homeostase global atuando como sensor de distúrbios externos ou internos.⁴⁶

É reconhecido que o hipotálamo, a hipófise e a glândula adrenal (HHA) são órgãos dinâmicos durante o desenvolvimento fetal, e que o desenvolvimento do eixo HHA é essencial para regulação da homeostase intra-uterina, maturação e diferenciação dos órgãos vitais necessários para sobrevivência neonatal. Respostas de estresse em crianças indicam que o sistema neuroendócrino é responsivo a eventos estressantes ao nascer.⁴⁷

A pele humana pode ser afetada por hormônios, que regulam a homeostase cutânea. As células epidérmicas podem metabolizar hormônios, e os receptores cutâneos ativos podem converter sinais hormonais em respostas fisiológicas.⁴⁶ Desta forma, a estimulação cutânea pode produzir mudanças metabólicas e fisiológicas no que se refere ao sistema neuroendócrino e imunológico.^{46,42} A interação entre pele e o sistema neuroendócrino é demonstrada através da procura em manter a homeostase interna e externa, mediante a capacidade de metabolizar, coordenar e organizar estímulos externos.⁴⁷

Terapias complementares como a ETC, que envolvam esse contato com a pele humana e visem um cuidado humanizado e integral podem trazer uma série de benefícios aos RNPT, como no método canguru, que foi instituído no Brasil e já mostra resultados inequívocos na redução de mortalidade, hipotermia, sepse e tempo de internação, além de benefícios no crescimento, amamentação e vínculo entre mãe e RN.⁴⁸ O Método Canguru é uma tecnologia de saúde que mudou o paradigma da assistência neonatal no Brasil ampliando os cuidados prestados aos RN, envolvendo, principalmente, duas questões: a inclusão de estratégias neuropsicoprotetoras, e a atenção às relações afetivas significativas com seus familiares e equipe neonatal.

Essa abrangência deriva da compreensão de que o sucesso do tratamento de um recém-nascido internado em unidade terapia intensiva neonatal não é determinado apenas pela sua sobrevivência e alta hospitalar, mas também pela construção de vínculos, fundamentais para que os cuidados após a alta sejam assegurados.⁴⁸

CONCLUSÃO

- 1- Houve aumento dos níveis de cortisol pós- somente no grupo controle.
- 2- Houve queda da FC e FR pós- intervenção e pós- 30 min comparando com momentos anteriores e aumento da Sat O₂ pós- 30 min comparando com todos os outros momentos, considerando ambos os grupos.
- 3- Não houve alteração da temperatura corporal.

AGRADECIMENTOS

À todas as mães dos recém-nascidos pré-termo, que deram autorização para realização desta pesquisa. Ao laboratório do CAISM, no qual foi feita a centrifugação e armazenamento das amostras. Ao laboratório da Science-Pro pela realização da dosagem do cortisol nas amostras de salivas de coletadas durante o projeto. Ao setor de estatística da FCM/UNICAMP que realizou o cálculo dos dados.

BIBLIOGRAFIA

1. Newnham CA, Inder TE, Milgrom J. Measuring preterm cumulative stressors within the NICU: the Neonatal Infant Stressor Scale. *Early Hum Dev* 2009;85: 549–55.
2. Morelius E, Nelson N, Theodorsson E. Saliva collection using cotton buds with wooden sticks: a note of caution. *Scand J Clin Lab Invest*. 2006;66(1):15-8.
3. Field T, Diego M, Hernandez-Reif M. Moderate pressure is essential for massage therapy effects. *Int J Neurosci*. 2010; 120(5):381-5.
4. Dieter JN, Field T, Hernández-Reif M, Emory EK, Redzepi M. Stable preterm infants gain More weight and sleep less after five days of massage therapy. *J Pediatr Psychol*. 2003; 28(6):403-11.

5. Gonzalez AP, Vasquez-Mendoza G, García-Vela A, Guzmán-Ramírez A, Salazar-Torres M, Romero-Gutierrez G. Weight gain in preterm infants following parent-administered Vimala massage: a randomized controlled trial. *Am J Perinatol.* 2009; 26(4):247-52
6. Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M, Deeds O, Ascencio A, Begert G. Preterm infant massage elicits consistent increases in vagal activity and gastric motility that are associated with greater weight gain. *Acta Paediatr.* 2007; 96(11):1588-91.
7. Field TM, Schanberg SM, Scafidi F, Bauer CR, Vega-Lahr N, Garcia R, *et al.* Tactile/kinesthetic stimulation effects on preterm neonates. *Pediatrics.* 1986; 77(5):654-8.
8. Mendes EW, Procianoy RS. Massage therapy reduces hospital stay and occurrence of late-onset sepsis in very preterm infants. *J Perinatol.* 2008; 28(12):815-20.
9. Moyer-Mileur LJ, Brunstetter V, McNaught TP, Gill G, Chan GM. Daily physical activity program increases bone mineralization and growth in preterm very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2000;106:1088-92.
10. Vignochi CM, Miura E, Canani LH. Effects of motor physical therapy on bone mineralization in premature infants: a randomized controlled study. *J Perinatol.* 2008;28:624-31.
11. Vignochi CM, Silveira RC, Miura E, Canani LH, Procianoy RS. Physical therapy reduces bone resorption and increases bone formation in preterm infants. *Am J Perinatol.* 2012;29: 573-8.
12. Mooncey S, Giannakouloupoulos X, Glover V, Acolet D, Modi N . The effect of mother-infant skin-to-skin contact on plasma cortisol and β -endorphin concentrations in preterm newborns. *Infant Behav Dev.* 1997; 20: 553-7.
13. Acolet D, Modi N, Giannakouloupoulos X, Bond C, Weg W, Clow A, Glover V. Changes in plasma cortisol and catecholamine concentrations in response to massage in preterm infants. *Arch Dis Child.* 1993; 68: 29-31.
14. Field, T., Schanberg, S., Davalos, M., & Malphurs, J. Massage with oil has more positive effects on normal infants. *Pre- and Perinatal Psychology Journal*, 1996; 11, 75-80.
15. Hernandez-Reif M, Diego M, Field T. Preterm Infant show reduced stress behaviors and activity after 5 days of massage therapy. *Infant Behavior and Development.* 2007; 30(4):557–61.
16. Guzzetta A, et al. The effects of preterm infant massage on brain electrical activity. *Dev Med Child Neurol.* 2011 Sep;53 Suppl 4:46-51.
17. Guzzetta A, et al. Massage Accelerates Brain Development and the Maturation of Visual Function. *J Neurosci*, May 6, 2009 • 29(18):6042– 6051

18. Field T, Diego M, Hernandez-Reif M, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 increased in preterm neonates. *J Dev Behav Pediatr.* 2008; 29:463-6.
19. V. Zeiner et al. Preterm infants' behaviors and skin conductance responses to nurse handling in the NICU. *J Matern Fetal Neonatal Med,* 2016; 29(15): 2531–2536.
20. Schwilling D, Vogeser M, Kirchhoff F, Schwaiblmair F, Boulesteix AL, Schulze A, *et al.* Live music reduces stress levels in very low-birthweight infants. *Acta Paediatr.* 2015;104(4):360-7.
21. Ahmed RG, Suliman GI, Elfakey WA, Salih KM, El-Amin EI, Ahmed WA, *et al.* Effect of tactile kinesthetic stimulation on preterm infants' weight and length of hospital stay in Khartoum, Sudan. *Saudi Med J.* 2015;36(2):196-9.
22. Conde-Agudelo A, Diaz-Rossello JL. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016(8):Cd002771.
23. Lyngstad, Lene Tandle, Tandberg BS, Storm H, Ekeberg BL, Moen A. "Does skin-to-skin contact reduce stress during diaper change in preterm infants?." *Early Hum Dev.* 90.4 (2014): 169-172.
24. Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE, Jr. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J Pediatr.* 2002;140(1):116-8.
25. Mitchell A, Chang J, Yates C, Hall RW. Challenges, guidelines, and systemic review of salivary cortisol research in preterm infants. *e-Journal Neonatol Res.* 2012:2.
26. Field TM, Schanberg SM, Scafidi F, *et al.* Tactile/kinesthetic stimulation effects on preterm neonates. *Pediatrics.* 1986; 77(5):654-8
27. Candia MF, Osaku EF, Leite MA, Toccolini B, Costa NL, Teixeira SN, et al. Influence of prone positioning on premature newborn infant stress assessed by means of salivary cortisol measurement: pilot study. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2014;26(2):169-75.
28. Álvarez MJ, Fernández D. The effects of massage therapy in hospitalized preterm neonates: A systematic review. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2017.02.009>
29. Moore TA, Schmid KK, French JA. Comparison of cortisol samples in the first two weeks of life in preterm infants. *J Pediatr Endocr Met.* 2015;28(3-4):415-20.
30. Moore TA, Wilson ME, Schmid KK, Anderson-Berry A, French JA, Berger AM. Relations between feeding intolerance and stress biomarkers in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57(3):356-62.
31. Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE, Jr. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J Pediatr.* 2002;140(1):116-8.

32. Chou IC, Lien HC, Lin HC, Fu JJC, Kao CH, Tsai CH, et al. The relationship of salivary and cord blood cortisol in preterm infants. *J Pediatr Endocr Met.* 2011;24(1-2):85-8.
33. Cong X, Ludington-Hoe SM, Walsh S. Randomized crossover trial of kangaroo care to reduce biobehavioral pain responses in preterm infants: a pilot study. *Biol Res Nurs.* 2011;13(2):204-16.
34. Morelius E, He HG, Shorey S. Salivary Cortisol Reactivity in Preterm Infants in Neonatal Intensive Care: An Integrative Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(3).
35. Badiie Z, Nassiri Z, Armanian A. Cobedding of twin premature infants: calming effects on pain responses. *Pediatr Neonatol.* 2014;55(4):262-8.
36. Morelius E, He HG, Shorey S. Salivary Cortisol Reactivity in Preterm Infants in Neonatal Intensive Care: An Integrative Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(3).
37. Scafidi FA1, Field TM, Wheeden A, Schanberg S, Kuhn C, Symanski R, et al. Cocaine-exposed preterm neonates show behavioral and hormonal differences. *Pediatrics.* 1996 Jun;97(6 Pt 1):851-5.
38. Mieko Shimada, PhD; Masaya Segawa, MD; Makoto Higurashi, MD; Rumiko Kimura, PhD; Kikuko Oku, MD et al. Effects of phototherapy in neonates on circadian sleep-wake and saliva cortisol level rhythms. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2003 Jul-Sep;17(3):222-31.
39. Yu T1, Balch AH1, Ward RM2, Korgenski EK3, Sherwin CM4. Incorporating pharmacodynamic considerations into caffeine therapeutic drug monitoring in preterm neonates. *MC Pharmacol Toxicol.* 2016 Jun 7;17(1):22. doi: 10.1186/s40360-016-0065-x.
40. Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M. Temperature increases in preterm infants during massage therapy. *Infant Behav Dev.* 2008;31(1): 149-152.
41. Boundy EO, Dastjerdi R, Spiegelman D, *et al.* Kangaroo Mother Care and Neonatal Outcomes: A Meta-analysis. *Pediatrics.* 2016;137(1):e20152238.
42. Zeiner V, Storm H, Doheny KK. Preterm infants' behaviors and skin conductance responses to nurse handling in the NICU. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015; 29:15.
43. Holsti L, Grunau RE, Oberlander TF, Whitfield, MD. Specific newborn individualized developmental care and assessment program movements are associated with acute pain in preterm infants in the neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2004;114:65–72.
44. Chang YJ1, Anderson GC, Lin CH. Effects of prone and supine positions on sleep state and stress responses in mechanically ventilated preterm infants during the first postnatal week. *J Adv Nurs.* 2002 Oct;40(2):161-9.
45. Field T. Massage Therapy. *Med Clin North Am.* 2002 Jan;86(1):163-71.

46. Slominski, A, Wortsman, J. J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Ver.* 2000;21(5):457-87.
47. Fogaça, MC; Carvalho WB; Verreschi, ITN. Tactile-kinesthetic stimulation: integration between skin and endocrine system? *Rev. Bras. Saúde Matern. Unfant*; 6(3): 277-283, jul.-set. 2006.
48. Lamy ZC, Morsch DS, Marba STM, Lamy Filho F. O método canguru nos dias atuais. In: Sociedade Brasileira de Pediatria: Procianoy RS, Leone CR, organizadores. *PRORN Programa de Atualização em Neonatologia: Ciclo 14*. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2017. P.11-41. (Sistema de Educação Continuada a Distância, v. 3)

ANEXO 1: DESCRITIVA E AVALIAÇÃO DADOS PRÉ (TESTE DE MANN-WHITNEY)

CORTISOL

Grupo	Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max	P-valor
1	Cortisol pré	15	0.038	0.036	0.022	0.010	0.090	0.4960
	Cortisol pós	15	0.036	0.036	0.020	0.007	0.088	
2	Cortisol pré	17	0.035	0.032	0.022	0.008	0.097	
	Cortisol pós	17	0.047	0.037	0.026	0.005	0.098	

Fator	P-valor
Grupo	0.8049
Tempo	0.0227
Tempo*grupo	0.0464 (fatores não são independentes)

Avaliação em cada tempo:

Pré:		Pós:	
Fator	P-valor	Fator	P-valor
Grupo	0.5117	Grupo	0.2812

Avaliação em cada grupo:

Grupo 1:		Grupo 2:	
Fator	P-valor	Fator	P-valor
Tempo	0.8224	Tempo	0.0056 (pós >pré)

ANEXO 2: DESCRITIVA E AVALIAÇÃO DADOS PRÉ (TESTE DE MANN-WHITNEY)

FC

Grupo	Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max	P-valor
1	FC antes	16	158.38	155.00	10.95	142.00	175.00	0.2710
	FC pré ETC	16	155.13	155.50	9.07	131.00	171.00	
	FC pós ETC	16	148.25	149.50	15.93	123.00	193.00	
	FC pós 30 min	16	153.94	157.00	18.98	123.00	200.00	
2	FC antes	17	153.76	152.00	10.60	130.00	168.00	
	FC pré ETC	17	153.82	153.00	10.94	138.00	172.00	
	FC pós ETC	17	153.71	153.00	9.62	136.00	171.00	
	FC pós 30MIN	17	150.06	151.00	9.60	132.00	171.00	

Fator	P-valor
Grupo	0.7392
Tempo	0.0260 (dif. significativa: antes > pós ETC; pré ETC > pós ETC)
Tempo*grupo	0.0510

ANEXO 3: DESCRITIVA E AVALIAÇÃO DADOS PRÉ (TESTE DE MANN-WHITNEY)

FR

Grupo	Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max	P-valor
1	FR antes	15	51.47	52.00	4.64	42.00	58.00	0.8789
	FR pré ETC	15	48.80	48.00	5.35	42.00	58.00	
	FR pós ETC	15	47.27	46.00	4.77	42.00	58.00	
	FR pós 30 min	15	47.60	48.00	5.14	39.00	57.00	
2	FR antes	17	51.76	52.00	6.05	41.00	60.00	
	FR pré ETC	17	52.53	53.00	6.05	42.00	61.00	
	FR pós ETC	17	51.35	52.00	6.04	41.00	59.00	
	FR pós 30 min	17	49.76	48.00	5.65	42.00	60.00	
Fator	P-valor							
Grupo	0.1344							
Tempo	0.0092 (dif. significativa: antes > pós ETC; antes > pós 30mn; pré ETC > pós 30min)							
Tempo*grupo	0.1649							

ANEXO 4: DESCRITIVA E AVALIAÇÃO DADOS PRÉ (TESTE DE MANN-WHITNEY)

SATO₂

Grupo	Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max	P-valor
1	SAT O2 pré	16	97.38	97.50	2.22	92.00	100.00	0.4549
	SAT O2 pré ETC	16	97.00	97.00	2.80	91.00	100.00	
	SAT O2 pós ETC	16	98.50	98.50	1.55	96.00	100.00	
	SAT O2 pós 30 min	16	97.63	98.00	2.36	93.00	100.00	
2	SAT O2 pré	17	96.71	97.00	2.17	93.00	100.00	
	SAT O2 pré ETC	17	96.65	97.00	2.74	91.00	100.00	
	SAT O2 pós ETC	17	97.47	97.00	1.97	92.00	100.00	
	SAT O2 pós 30 MIN	17	96.88	98.00	2.23	92.00	100.00	

Fator		P-valor						
Grupo		0.3180						
Tempo		0.0115 (dif. significativa: pós ETC > demais)						
Tempo*grupo		0.7260						

ANEXO 5: DESCRITIVA E AVALIAÇÃO DADOS PRÉ (TESTE DE MANN-WHITNEY)

TEMPERATURA CORPORAL

Grupo	Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max	P-valor
1	Temp pré	15	36.77	36.80	0.14	36.50	37.00	0.4758
	Temp pós ETC	15	36.83	36.70	0.59	36.40	38.90	
	Temp pós 30 MIN	15	36.71	36.80	0.14	36.40	36.90	
2	Temp pré	17	36.77	36.70	0.32	36.40	37.70	
	Temp pós ETC	17	36.70	36.70	0.20	36.40	37.10	
	Temp pós 30 MIN	17	36.72	36.70	0.20	36.30	37.00	

Fator	P-valor
Grupo	0.6972
Tempo	0.1131
Tempo*grupo	0.3985

DISCUSSÃO GERAL

Diferentes formas de minimizar as consequências negativas relacionadas aos cuidados necessários em uma UTIN tem sido inseridas nos hospitais. A massagem é proposta como um meio de reduzir o impacto negativo sobre o recém-nascido e sua família, em que terapeutas aptos e especialmente treinados possam ensinar os pais/familiares a praticarem com segurança, mesmo entre os RNPT, com base na estabilidade fisiológica e manutenção de escores de agitação/dor observados em neonatos que receberam massagem.³⁵

Para determinação da metodologia deste projeto, realizou-se ampla pesquisa, das quais surgiram duas revisões sistemáticas, uma analisando os métodos de aplicação da ETC, para nortear a escolha da técnica de aplicação mais indicado, e outra analisando quais os métodos utilizados para de coleta de saliva em RNPT para dosar o cortisol salivar em RNPT.

De acordo com a revisão sistemática realizada pelos pesquisadores em 2014/ 2015, na qual o objetivo foi verificar quais metodologias foram usadas por ensaios clínicos que avaliaram o efeito da ETC sobre o ganho de peso de RNPT e destacar as diferenças e semelhanças entre esses estudos, concluímos que não houve padrão de aplicação entre os estudos, porém a grande maioria obteve resultados positivos tanto no ganho de peso como na diminuição do tempo de internação nos grupos que receberam algum tipo de ET, entre outros benefícios, como amenização de comportamentos de estresse³⁶, melhora do desenvolvimento neurocomportamental,³⁷ além de efeitos benéficos sobre o sistema imunológico.³⁸

O aumento do ganho de peso foi relacionado à maior motilidade gástrica e aumento atividade vagal,^{39,40} menor gasto energético, aumento dos níveis séricos de insulina e do IGF-1.^{41,42} A variação da pressão (leve ou moderada) utilizada para realização da técnica, assim como utilizar a ETC ou desmembrar em Estimulação Tátil e Estimulação Cinestésica, também foram pontos estudados por diferentes autores, que concluíram que a ETC com pressão moderada parece ter melhor efeito sobre o ganho de peso.⁴³ Ademais, alguns estudos que utilizaram somente EC obtiveram resultados não apenas em maior ganho de peso, mas também maior mineralização óssea.⁴⁴⁻⁴⁶

Desta forma, a ETC escolhida foi a mais usada nos estudos científicos encontrados e a que possuía protocolo estabelecido. Para realização da aplicação da técnica, fez-se um treinamento com a equipe da pesquisadora que primeiro descreveu a técnica da forma aplicada, Dra. Field.²¹

Quanto ao método de coleta da saliva, a metodologia escolhida foi utilização do Swab Infantil, desenvolvido especialmente bebês até 6 meses, uma vez que a aspiração pode ser considerada como invasiva e causar danos a mucosa oral do RN.⁴⁷ Na revisão feita sistematicamente da literatura, cujo objetivo foi evidenciar quais métodos utilizados na coleta de saliva em ensaios clínicos com RNPT para a dosagem de cortisol, descritos nos últimos 10 anos, obtiveram maior sucesso na coleta de saliva e vantagens e desvantagens reportadas em cada um deles. Observou-se que foram utilizados basicamente dois métodos de coleta da saliva: aspiração e uso de material absorvente. Os materiais utilizados para cada um dos métodos variou bastante, assim como o tempo de coleta. Esses dados foram descritos e analisados, através de uma metanálise que demonstrou que a aspiração parece ter menor chance de perda das amostras. Ressaltamos porém que apenas 33.3% (3 de 9) dos estudos que utilizaram aspiração relataram o número de amostras perdidas, contra 81.8% (18 de 22) dos que utilizaram material absorvente. Isso pode ser um importante viés, pois não está claro se os estudos que não descreveram as perdas, de fato não dispuseram destas.

Durante a realização do ensaio clínico que fizemos para esta tese, como precaução à perda das amostras por quantidade insuficiente de saliva para dosagem de cortisol, após a centrifugação foi realizada uma análise subjetiva através da observação da quantidade de saliva aparente no tubo coletor e, se essa quantidade de saliva extraída parecesse ser insuficiente, nova coleta fora feita no dia seguinte, se possível (pois o RN poderia ter alta ou ser transferido de hospital, ou ainda passar para berço comum). A perda foi de 1,5% já que 65 das 66 amostras contiveram quantidade suficiente de saliva para dosagem dos níveis de cortisol. Porém, o único caso que não obteve a quantidade necessária para dosagem, não foi refeito pois o RN foi transferido para berço comum no mesmo dia, inviabilizando nova coleta.

A seleção dos sujeitos foi feita seguindo todos os padrões pré-determinados com visitas diárias ao setor de neonatologia do CAISM, em diferentes períodos do dia, para que fosse possível encontrar os pais/responsáveis para autorização e assinatura do TCLE. Ainda, os RN com o peso determinado para o estudo e com o padrão de estabilidade necessário, encontram-se na transição de incubadora ou berço aquecido para berço comum ou alta, sendo uma condição breve.

Durante a coleta e procedimento foram observados sinais de incômodo como choro leve, caretas, aumento de FC com retorno rápido principalmente nas trocas de decúbito. Apenas 2 casos apresentaram choro mais intenso, sendo 1 de cada grupo, e nesses casos o procedimento foi interrompido e refeito no dia seguinte. Os demais, permaneceram dormindo ou tranquilos durante o período de coleta e intervenção. A temperatura foi medida em três momentos, antes da primeira coleta de saliva, logo após término da ETC/troca de decúbito e após a segunda coleta de saliva, como precaução à perda de calor pela manutenção da incubadora aberta durante o procedimento.

A inclusão da troca de decúbito no grupo controle foi uma tentativa de isolar o procedimento de estimulação tátil e cinestésica propriamente dito, da troca de decúbito necessária para realização da ETC seguindo o protocolo adotado,²¹ uma vez que o simples manuseio do RNPT pode alterar respostas comportamentais.^{48,49} Assim, não manusear o grupo controle seria um importante viés. Mesmo com essa troca de decúbito, ambos os grupos tiveram queda da FR e FC, além de aumento da SatO₂ pós- intervenção. Os dois grupos permaneceram por 30 min na posição prono, que segundo estudos diminui os níveis de cortisol⁸, mas o grupo que não recebeu a ETC teve aumento do cortisol salivar pós- quando comparado ao nível pré-, sendo os grupos eram homogêneos quando analisados os níveis de cortisol pré- intervenção. Isso sugere que a ETC pode gerar conforto, já que o toque e a massagem terapêutica liberam serotonina, eliminam as tensões, além auxiliarem na eliminação de toxinas, entre outros benefícios.⁵⁰

Sinais de desconforto como choro, caretas, movimentação de membros, aumento de FC, apesar de não frequentes, aconteceram principalmente nas trocas de decúbito, em ambos os grupos. Sendo assim, estudos futuros poderiam explorar a aplicação de técnicas de ETC, de forma abreviada, sem fazer todas as trocas de decúbito.

CONCLUSÃO GERAL

- 1-Houve aumento dos níveis de cortisol pós- somente no grupo controle.
- 2-Houve queda da FC e FR pós- intervenção e pós- 30 min comparando com momentos anteriores e aumento da Sat O₂ pós- 30 min comparando com todos os outros momentos, considerando ambos os grupos.
- 3-Não houve alteração da temperatura corporal.

Terapias complementares, como a ETC, associadas ao tratamento padrão devem ser consideradas, uma vez que mesmo ganhos discretos nessa população podem acarretar grande benefícios futuros. Além disso, métodos de coleta menos invasivos que avaliem essas terapias, como dosagem de cortisol salivar, parecem ser seguros e válidos. Estudos futuros com elevado rigor metodológico devem ser encorajados, para que se estabeleçam padrões seguros que possam ser reproduzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Carvalho M, Gomes MA. A mortalidade do prematuro extremo em nosso meio: realidade e desafios. J Pediatr. 2005;81(1 Supl):S111-8.
- 2- Peters KL. Bathing premature infants: physiological and behavioral consequences. Am J Crit Care. 1998; 7(2):90-100
- 3- Liaw, JJ. Effects of tub bathing procedures on preterm infants' behavior. J Nurs Res. 2006; 14:297-305.
- 4- Vilar DM. Efeitos da contenção facilitada durante a aspiração endotraqueal sobre a concentração salivar de cortisol e saturação de oxigênio de recém nascidos prematuros. Campinas. Tese [Mestrado]. - Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- 5- Smith GC, Gutovich J, Smyser C, Pineda R, Newnham C, Tjoeng TH et al. Neonatal intensive care unit stress is associated with brain development in preterm infants. Ann Neurol. 2011;70:541-9.

- 6- Pinto EF, Silva IL, Cardoso F, Beresford H. O estresse no neonato pré-termo: uma reflexão axiológica acerca de possíveis influências dos fatores sensório-ambientais em unidades de terapia intensiva neonatal. *Fit Perf J.* 2008 set-out;7(5):345-51.
- 7- De Jong M, Cranendonk A, Van Weissenbruch MM. Salivary and serum cortisol and relation to blood pressure in infancy and early childhood in very-low-birth-weight infants. *Pediatr Res.* 2015;78(4):476-9.
- 8- Ahmed RG, Suliman GI, Elfakey WA, Salih KM, El-Amin EI, Ahmed WA, *et al.* Effect of tactile kinesthetic stimulation on preterm infants' weight and length of hospital stay in Khartoum, Sudan. *Saudi Med J.* 2015;36(2):196-9.
- 9- Conde-Agudelo A, Diaz-Rossello JL. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016(8):Cd002771.
- 10- Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE, Jr. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J Pediatr.* 2002;140(1):116-8.
- 11- Silva ML, Mallozi MC, Ferrari GF. Cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal em crianças saudáveis menores de 3 anos. *Jornal de Pediatria Print version ISSN 0021-7557J. Pediatr. (Rio J.) vol.83 no.2 Porto Alegre Mar./Apr. 2007* <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572007000200005>
- 12- Moore TA, Schmid KK, French JA. Comparison of cortisol samples in the first two weeks of life in preterm infants. *J Pediatr Endocr Met* 2014.
- 13- Field T, Diego M, Hernandez-Reif M. Preterm infant massage therapy research: a review. *Infant Behav Dev.* 2010; 33(2):115-24.
- 14- Field T. Preterm infant massage therapy studies: an American approach. *Semin Neonatol.* 2002; 7(6):487-94.
- 15- Hernandez Reif M, Field T, Diego M, Beutler J. Evidence-based medicine and massage. *Pediatrics.* 2001; 108(4):1053.
- 16- Field TM, Schanberg SM, Scafidi F, Bauer CR, Vega-Lahr N, Garcia R, *et al.* Tactile/kinesthetic stimulation effects on preterm neonates. *J Early Child Educ J.* 2000; 27(4):255-7.
- 17- Field T, Diego M, Hernandez-Reif M. Moderate pressure is essential for massage therapy effects. *Int J Neurosci.* 2010; 120(5):381-5.
- 18- Dieter JN, Field T, Hernández-Reif M, Emory EK, Redzepi M. Stable preterm infants gain More weight and sleep less after five days of massage therapy. *J Pediatr Psychol.* 2003; 28(6):403-11.

- 19- Gonzalez AP, Vasquez-Mendoza G, García-Vela A, Guzmán-Ramirez A, Salazar-Torres M, Romero-Gutierrez G. Weight gain in preterm infants following parent-administered Vimala massage: a randomized controlled trial. *Am J Perinatol*. 2009; 26(4):247-52.
- 20- Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M, Deeds O, Ascencio A, Begert G. Preterm infant massage elicits consistent increases in vagal activity and gastric motility that are associated with greater weight gain. *Acta Paediatr*. 2007; 96(11):1588-91.
- 21- Field TM, Schanberg SM, Scafidi F, Bauer CR, Vega-Lahr N, Garcia R, et al. Tactile/kinesthetic stimulation effects on preterm neonates. *Pediatrics*. 1986; 77(5):654-8.
- 22- Mendes EW, Procianoy RS. Massage therapy reduces hospital stay and occurrence of late-onset sepsis in very preterm infants. *J Perinatol*. 2008; 28(12):815-20.
- 23- Massaro AN, Hammad TA, Jazzo B, Aly H. Massage with kinesthetic stimulation improves weight gain in preterm infants. *J Perinatol*. 2009; 29(5):352-7.
- 24- Field T, Diego MA, Hernandez-Reif M, Deeds O, Figuereido B. Moderate versus light pressure massage therapy leads to greater weight gain in preterm infants. *Infant Behav Dev*. 2006; 29(4):574-8.
- 25- Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M. Vagal activity, gastric motility, and weight gain in massaged preterm neonates. *J Pediatr*. 2005; 147(1):50-5.
- 26- Thoman EB. Sleep and wake behaviors in neonates: consistencies and consequences. *Merrill Palmer Quarterly*. 1975; 21(4):295-314.
- 27- Hernandez-Reif M, Diego M, Field T. Preterm Infant show reduced stress behaviors and activity after 5 days of massage therapy. *Infant Behavior and Development*. 2007; 30(4):557–61.
- 28- Lahat S, Mimouni FB, Ashbel G, Dollberg S. Energy expenditure in growing preterm infants receiving massage therapy. *J Am Coll Nutr*. 2007; 26(4):356-9.
- 29- Field, T., Schanberg, S., Davalos, M., & Malphurs, J. Massage with oil has more positive effects on normal infants. *Pre- and Perinatal Psychology Journal*, 1996; 11, 75-80.
- 30- Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M. Temperature increases in preterm infants during massage therapy. *Infant Behav Dev*. 2008; 31(1):149-52.
- 31- Bond C. Positive Touch and massage in the neonatal unit: a British approach. *Semin Neonatol* 2002; 7: 477–486 doi:10.1053/siny.2002.0149.

- 32- Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr.* 1991; 119(3):417-23.
- 33- Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States National Reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996;87(2):163-8.
- 34- Vickers Andrew, Ohlsson Arne, Lacy Janet, Horsley Angela. Massage for promoting growth and development of preterm and/or low birth-weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* In: The Cochrane Library, Issue 06, Art. No. CD000390. DOI: 10.1002/14651858.CD000390.pub3No. CD000390. DOI:10.1002/14651858.CD000390.pub3
- 35- Livingston K, Beider S, Kant AJ, Gallardo CC, Joseph MH, Gold JI. Touch and massage for medically fragile infants. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009;6(4):473-82.
- 36- Hernandez-Reif M, Diego M, Field T. Preterm infants show reduced stress behaviors and activity after 5 days of massage therapy. *Infant Behav Dev.* 2007; 30(4):557-61.
- 37- Procianoy, R.S. and Mendes, E.W. and Silveira, R.C. Massage therapy improves neurodevelopment outcome at two years corrected age for very low birth weight infants. *Early Hum Dev.* 2010; 86:7-11.
- 38- Mendes EW, Procianoy RS. Massage therapy reduces hospital stay and occurrence of late-onset sepsis in very preterm neonates. *J Perinatol.* 2008;28(12):815-20.
- 39- Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M. Vagal activity, gastric motility, and weight gain in massaged preterm neonates. *J Pediatr.* 2005;147(1):50-5.
- 40- Diego MA, Field R, Hernandez-Reif M, Deeds O, Ascencio A, Bergert C. Preterm infant massage elicits consistent increases in vagal activity and gastric motility that are associated with greater weight gain. *Acta Paediatr.* 2007;96:1588-91.
- 41- Field T, Diego M, Hernandez-Reif M, Dieter JN, Kumar AM, Schanberg S, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 increased in preterm neonates. *J Dev Behav Pediatr.* 2008; 29:463-6.
- 42- Moyer-Mileur LJ, Haley S, Slater H, Beachy J, Smith SL. Massage improves growth quality by decreasing body fat deposition in male preterm infants. *J Pediatr.* 2013;162(3):490-5.
- 43- Massaro AN, Hammad TA, Jazzo B, Aly H. Massage with kinesthetic movement improves weight gain in preterm infants. *J Perinatol.* 2009;29:352-7.
- 44- Moyer-Mileur LJ, Brunstetter V, McNaught TP, Gill G, Chan GM. Daily physical activity program increases bone mineralization and growth in preterm very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2000; 106(5):1088-92.

- 45- Vignochi CM, Miura E, Canani LH. Effects of motor physical therapy on bone mineralization in premature infants: a randomized controlled study. *J Perinatol*. 2008; 28:624-631.
- 46- Vignochi CM, Silveira RC, Miura E, Canani LH, Procianoy RS. Physical therapy reduces bone resorption and increases bone formation in preterm infants. *Am J Perinatol*. 2012;29:573-578.
- 47- Ng SM, Turner M, Drury J, Didi M, Victor S, Newland P, et al. Correlation of early morning plasma cortisol and salivary cortisol in extremely premature infants. *Horm Res Paediat*. 2012;78:218.
- 48- Zeiner V, Storm H, Doheny KK. Preterm infants' behaviors and skin conductance responses to nurse handling in the NICU. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2015; 29:15.
- 49- Holsti L, Grunau RE, Oberlander TF, Whitfield, MD. Specific newborn individualized developmental care and assessment program movements are associated with acute pain in preterm infants in the neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2004;114:65–72.
- 50- Field T. Massage Therapy. *Med Clin North Am*. 2002 Jan;86(1):163-71.

Apêndice 1: Licença artigo JPED

Re: license [170517-008357] (2)

Finan

Researcher Support <support@elsevier.com>

May 19 at 9:57 AM

To: vanpepino@yahoo.com

Dear Vanessa

Article reference - JPED 242.

Thank you for your enquiry.

Please be advised that you do not need to obtain permission to use your own work in your personal thesis. For further information on how you can use and promote your work please see the following link:-

<https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright/personal-use>

If I can be of further assistance please do not hesitate to contact me.

Regards

Deb Aust

Elsevier Researcher Support,

Open Access

Telephone: +44 (0)1865 843839

for live chat go to 'Help & Contact' on www.elsevier.com

Apêndice 2: Certificado de treinamento



ANEXO 1-Lista de checagem para inclusão

CRITÉRIOS	INCLUI	EXCLUI
Peso ao nascer <2000g (checar curva de peso atualizada)	☐ S ☐ N	
IG <37 semanas	☐ S ☐ N	
Internação em semi-intensivo	☐ S ☐ N	
Ausência de venóclise	☐ S ☐ N	
100% da oferta láctea por VO ou SNG intermitente	☐ S ☐ N	
Sem intercorrências clínicas há 5 dias(dessaturação e apnéia não serão consideradas intercorrências)	☐ S ☐ N	
Síndromes genéticas		☐ S ☐ N
Malformações congênitas		☐ S ☐ N
Asfixia perinatal		☐ S ☐ N
Alimentação contínua por sonda ou transpilórica		☐ S ☐ N
Infecções congênitas		☐ S ☐ N
Fraturas		☐ S ☐ N
Uso de Corticóide		☐ S ☐ N
Precaução de contato		☐ S ☐ N
Outros		☐ S ☐ N

RN de _____ **data**

nascimento: |__|__|__| **Nº no estudo** |__|__|__|

INCLUSO () EXCLUSO ()

Se houver recusa em assinar o TCLE, descrever motivos:

.....

ANEXO 2-Ficha para coleta de dados

RN de: _____

HC: _____ número do caso _____

Data hoje: _____ Idade: _____ dias de vida

CASO () CONTROLE () DATA NASCIMENTO: _____

sexo: F () M () Peso ao nascer: _____ g Peso do dia: _____ g

IG: AM () Ballard () outro () CAPURRO ECO ()

ATUALIZADA()

Adequação do peso para a idade: () AIG () PIG () GIG

Via de alimentação: () sonda naso/orogástrica () VO () Seio Materno vezes/dia

Incubadora () berço aquecido ()

Intercorrências desde nascimento: () sim () não

Quando e Qual ?

Intercorrência dia anterior: () não () sim

Qual? _____

Exames/procedimentos realizados no dia ou dia anterior:

Contato skin-to-skin dia anterior: () não () sim quem? _____

Visita dia anterior? () não () sim, quem? _____

Mãe usuária de Droga? () sim () Já usou () não

Qual Droga? _____

1)Dados fisiológicos: Coleta

	<i>Antes da coleta de saliva</i>	<i>Imediatamente antes/após procedimento</i>		<i>Depois de 30 minutos/pós coleta saliva</i>
		<i>ANTES</i>	<i>DEPOIS</i>	
<i>FC</i>				
<i>FR</i>				
<i>SaO₂</i>				
<i>Temperatura</i>				

Duração do procedimento: ____ min.

Intercorrências durante a ETC: Não () Sim () Bradicardia ()

Dessaturação () Taquicardia () outra ()

Intercorrência durante a Coleta da Saliva: Não () Sim ()

RN está fazendo uso de algum medicamento?? Não () Sim () qual??

ANEXO 3: TCLE

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Título: Dosagem de cortisol salivar pré e pós-estimulação tátil e cinestésica em recém-nascidos pré-termos: ensaio clínico randomizado e controlado

Responsável pela Pesquisa: Vanessa Carina Pepino Stelini

Orientador: Prof Dr. Sergio Tadeu Martins Marba

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Mezzacappa

Numero do CAAE:44635015.0.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo. Em ambos os casos isso não implicará no comprometimento do atendimento multidisciplinar da equipe do CAISM. Qualquer dúvida poderá ser esclarecida pelo pesquisador.

Justificativa e objetivos: Estamos realizando, aqui no CAISM, uma pesquisa para avaliar se o uso da massagem em bebês, que nasceram com peso abaixo de 2000g, pode diminuir o estresse, usando como parâmetro a medição na saliva do bebê de uma substância chamada de cortisol salivar. Antes e após a massagem, será feita a coleta de saliva do bebe, colocando um cotonete de algodão na boca do bebe e segurando por cerca de 10 minutos.

Serão sorteados 2 grupos, um dos grupos receberá além do tratamento padrão proposto pelos médicos, uma massagem específica para bebês prematuros com duração de 15 minutos, feita por uma fisioterapeuta treinada. Essa massagem será feita mais ou menos 1 hora após a mamada da manhã (6h). O outro grupo será o grupo controle, não receberá nenhum tratamento diferente do proposto pelos médicos que estão acompanhando o bebê, somente mudança de posicionamento e a coleta de saliva.

A massagem será feita por uma fisioterapeuta, responsável pela pesquisa, que foi treinada pela equipe do Instituto do Toque em Miami, onde já foram feitos vários estudos utilizando essa mesma técnica de massagem.

É um procedimento bastante simples, onde a fisioterapeuta fará deslizamentos pelo corpo do bebê, massageando, e depois fará alguns movimentos de dobrar e esticar os braçinhos e as perninhas. Poderemos demonstrar para a família o procedimento da massagem através de fotos e/ou vídeo, para maior esclarecimento.

Desconfortos e riscos: A massagem não causa dor, mas pode gerar algum desconforto como choro e/ou agitação. Se isso ocorrer e for acompanhado de aumento da frequência cardíaca e/ou respiratória (acima de 180bpm e 60ipm), o procedimento será interrompido imediatamente.

Benefícios: Estudos anteriores já demonstraram que podem existir benefícios após este tipo de massagem como maior ganho de peso, menor tempo de internação, diminuição de comportamentos estressantes dentre outros. Além disso, o procedimento poderá ser demonstrado pela pesquisadora, desta forma os pais poderão dar continuidade após a alta. Pode ser que seu bebê não obtenha nenhum dos

benefícios relatados acima, mas os conhecimentos gerados poderão ser de importância para outros recém-nascidos no futuro.

Sigilo e privacidade: As informações obtidas serão mantidas em segredo. Um ou duas crianças serão fotografadas e filmadas durante a realização da massagem para que os resultados do trabalho possam ser apresentados em aulas e congressos. No entanto, o nome do seu filho permanecerá sob sigilo, bem como tomaremos o cuidado para impedir a identificação da criança.

Repositório da saliva: O repositório de material biológico (saliva) ficará congelado no Laboratório de Clínico Especializado do CAISM, sob responsabilidade da pesquisadora principal. Ao final da coleta de dados, as amostras serão transportadas para São Paulo, onde as dosagens serão realizadas. Ao final do estudo eventuais sobras de material serão descartadas.

Contato: Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Vanessa Carina Pepino Stelini, telefone: (19) 99648-1049, vanpepino@yahoo.com, com o orientador Dr Sérgio Marba ou com a co-orientadora Dra Maria Aparecida Mezzacappa, telefone (19) 35219344, Setor de Neonatologia/CAISM/UNICAMP.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 13:30hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

Data: ____/____/____

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____

(Assinatura do pesquisador)

ANEXO 4: Parecer do CEP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Dosagem de cortisol salivar pré e pós-estimulação tátil e cinestésica em recém-

nascidos pré-termos.

Pesquisador: MARIA APARECIDA MARQUES DOS SANTOS MEZZACAPPA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44635015.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 1.112.877

Data da Relatoria: 22/06/2015

Apresentação do Projeto:

Existem evidências sobre a necessidade de minimizar os impactos negativos que a internação de pequenos prematuros em unidades de terapias intensiva pode causar. A estimulação tátil e cinestésica é um procedimento simples e não invasivo que tem sido proposto como um método que pode promover melhor ganho ponderal, diminuição da duração da internação, entre outros benefícios. Objetivo: verificar se a estimulação tátil cinestésica (ETC), realizada por um terapeuta durante o período de internação na unidade neonatal, promove diminuição do stress no RN pré- termo com peso ao nascer 2000g. Casuística e Métodos: Será realizado um ensaio clínico controlado randomizado não cego. Um grupo receberá a ETC e o outro não (controle). Serão incluídos RN internados em semi-intensivo, com peso ao nascer menor ou igual 2000g, idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, que estejam clinicamente estáveis. Serão excluídos os RN com síndromes genéticas, mal formações congênitas, alimentação por sonda gástrica contínua ou transpilórica, , infecções congênitas, fraturas e os que estiverem fazendo uso de corticóide. A ordem de inclusão dos sujeitos nos grupos obedecerá a uma lista de randomização, gerada por computador, transferida para envelopes pardos, lacrados e sequencialmente numerados. A coleta de saliva será feita antes e após 45 min. da ETC para avaliar se o procedimento diminui os níveis de cortisol. Serão avaliados frequência respiratória, frequência cardíaca, SatO₂, temperatura axilar antes e após a ETC. O cortisol será comparado pré e pós a intervenção, e com o grupo controle. O banco de dados será realizado em Excel e a análise estatística em SPSS v.16.0. Para comparar as variáveis categóricas entre os grupos será realizado o teste de Qui-quadrado e os testes de MannWhitney, Wilcoxon ou teste t-Student pareado ou não serão realizados para comparar as variáveis contínuas, intra os indivíduos e entre os grupos. O valor de p estabelecido será de 0,05.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar a eficácia e a segurança da ETC realizada, por um terapeuta, durante o período de internação na unidade neonatal, para a redução do estresse, em RNs pré- termos com peso ao nascer 2000g, comparando com grupo controle.

Objetivo Secundário:

1-Comparar o nível de cortisol antes e após 45 min do procedimento de ETC.2-Comparar o nível de cortisol antes e após 45 min do procedimento de ETC, com a dosagem obtida no grupo controle.3-Comparar a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e saturação da hemoglobina (SatO₂), temperatura corpórea imediatamente antes e após a ETC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estudos anteriores já demonstraram benefícios após este tipo de massagem como maior ganho de peso, menor tempo de internação, diminuição de comportamentos estressantes dentre outros. O procedimento poderá ser demonstrado pela pesquisadora, desta forma os pais poderão dar continuidade após a alta. Por ser feito apenas um dia pela pesquisadora, pode ser que seu bebê não obtenha nenhum dos benefícios relatados acima imediatamente, mas os conhecimentos gerados poderão ser de importância para outros recém-nascidos no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo prospectivo em RN prematuros menores de 2 kg que será realizado no CAISM. Será feita dosagem do cortisol salivar para avaliação do estresse dos RN pré-termos antes e após a Estimulação Tátil e Cinestésica (ETC), comparando com grupo controle que não receberá a ETC. A dosagem será feita com Kit de Cortisol de Alta sensibilidade, método ELISA, Salimetrics. Frequência cardíaca e Saturação de O₂ serão coletadas por meio do oxímetro de pulso, o qual os RN já estarão fazendo uso de rotina. A Frequência Respiratória e temperatura serão coletadas pela pesquisadora antes e após o procedimento, através do número de incursões respiratórias contadas em 1 minuto e a temperatura utilizando termômetro axilar digital.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto que esta sendo reavaliado somente com as seguintes pendências que foram respondidas:

- 1) TCLE- foi modificado de acordo com as solicitações. Esclareceu que os bebês é que são os participantes da pesquisa e os benefícios. Colocou local para rubrica no TCLE.
- 2) Orçamentamento- esclareceu a origem da verba (FAEPEX e FAPESP).

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

CAMPINAS, 18 de Junho de 2015

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini (Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira Camargo, 126 Bairro: Barão Geraldo, CEP: 13083-887, Campinas-SP.

Tel: (19) 2521-8936 Fax: (19) 3521-7187 email: [HYPERLINK](mailto:cep@fcm.unicamp.br)
"mailto:cep@fcm.unicamp.br"

ANEXO 5: Tabela análise estatística**DESCRITIVAS GERAIS**

Variável	N	Média	Mediana	D.P.	Min	Max

Peso ao nascer	33	1537.4	1570.0	257.57	915.00	1975.0
IG	27	31.78	32.00	2.28	28.00	36.00
Idade pós natal	33	16.97	15.00	10.18	6.00	50.00
Peso procedimento	33	1679.1	1620.0	270.46	1280.0	2535.0
Cortisol pré	32	0.04	0.03	0.02	0.01	0.10
Cortisol pós	32	0.04	0.04	0.02	0.01	0.10
FC antes	33	156.00	154.00	10.86	130.00	175.00
FC pré ETC	33	154.45	155.00	9.94	131.00	172.00
FC pós ETC	33	151.06	151.00	13.15	123.00	193.00
FC pós 30 min	33	151.94	151.00	14.79	123.00	200.00
FR antes	32	51.63	52.00	5.35	41.00	60.00
FR pré ETC	32	50.78	51.00	5.95	42.00	61.00
FR pós ETC	32	49.44	48.00	5.78	41.00	59.00
FR pós 30 min	32	48.75	48.00	5.44	39.00	60.00
SAT O2 pré	33	97.03	97.00	2.19	92.00	100.00
SAT O2 pré ETC	33	96.82	97.00	2.73	91.00	100.00
SAT O2 pós ETC	33	97.97	98.00	1.83	92.00	100.00
SAT O2 pós 30 min	33	97.24	98.00	2.29	92.00	100.00
TEMP pré	32	36.77	36.70	0.25	36.40	37.70
TEMP pós ETC	32	36.76	36.70	0.43	36.40	38.90
TEMP pós 30 min	32	36.72	36.75	0.17	36.30	37.00